



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Instituto de Biologia**

**CRISTOBAL ERVI BAUTISTA PEREZ**

**SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA RESISTENTE A FUNGOS VIA  
SILENCIAMENTO GÊNICO INDUZIDO PELO HOSPEDEIRO**

**GENETICALLY MODIFIED SOYBEANS RESISTANT TO FUNGAL BY HOST  
INDUCED GENE SILENCING**

**CAMPINAS**

**2020**

**CRISTOBAL ERVI BAUTISTA PEREZ**

**SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA RESISTENTE A FUNGOS VIA  
SILENCIAMENTO GÊNICO INDUZIDO PELO HOSPEDEIRO**

**GENETICALLY MODIFIED SOYBEANS RESISTANT TO FUNGAL BY HOST  
INDUCED GENE SILENCING**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Vegetal e Melhoramento.

Thesis presented to the Biology Institute of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Genetics and Molecular Biology, in the area of Plants Genetic and Breeding.

Orientador: Dr. Francisco José Lima Aragão

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
PELO ALUNO CRISTOBAL ERVI  
BAUTISTA PEREZ E ORIENTADA  
PELO DR. FRANCISCO JOSE LIMA  
ARAGÃO.

**CAMPINAS**

**2020**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B329s      Bautista Pérez, Cristobal Ervi, 1978-  
Soja geneticamente modificada resistente a fungos via silenciamento  
gênico induzido pelo hospedeiro / Cristobal Ervi Bautista Pérez. – Campinas,  
SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Francisco José Lima Aragão.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de  
Biologia.

1. Inativação gênica. 2. Fungos fitopatogênicos. 3. Soja. 4. Plantas  
transgênicas. 5. RNA interferente pequeno. I. Aragão, Francisco José Lima. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Genetically modified soybeans resistant to fungal by host induced gene silencing

**Palavras-chave em inglês:**

Gene silencing

Phytopathogenic fungi

Soybean

Transgenic plants

RNA, Small interfering

**Área de concentração:** Genética Vegetal e Melhoramento

**Titulação:** Doutor em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Francisco José Lima Aragão [Orientador]

Marcelo Menossi Teixeira

Henrique Marques-Souza

Rodrigo da Rocha Fragoso

Natália Lima de Sousa

**Data de defesa:** 15-12-2020

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4594-4876>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1726757936178676>

Campinas, 15 de dezembro 2020

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão (Orientador)

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

Prof. Dr Henrique Marques-Souza

Dra. Natália Lima de Sousa

Dr. Rodrigo da Rocha Fragoso

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Genética e Biologia Molecular da Unidade do Instituto de Biologia.

## **Dedicatória**

**À minha mãe,**

Pelo amor que ela me oferece, pelas suas bênçãos ao longo da minha vida e pelos seus sábios conselhos que me levam pelo caminho do bem. Por tudo isso e mais, este trabalho é dedicado especialmente à senhora.

## **Agradecimentos**

Eu agradeço a Deus pelos obstáculos que coloca no meu caminho. Nos momentos de dificuldades posso não compreender, mas quando chego ao topo da montanha, reconheço na paisagem a lição que Ele me deu.

Aos meus pais que sempre estão na minha vida em todo momento; aos meus irmãos: Elsa, Isaias, Manolo e Rolando pelo apoio incondicional; aos meus sobrinhos, Roiver, Erika, Jennifer, Guadalupe, Janessy, Esmeralda, Violeta, Aitana, Mateo e Gadiel por serem a alegria da família.

A Dra. Norma Ruiz por seu apoio para obtenção da bolsa no México. Ao M.C. Gerardo Arcos por crer em mim.

Ao Dr. Francisco Aragão por sua dedicada orientação, disponibilidade, apoio, incentivo e exemplo de profissional.

A Dra. Glaucia por sua disposição de me apoiar e orientar nos trabalhos do laboratório.

A Elsa que ela sempre me apoiou desde o início até o final do meu trabalho.

A todos os meus colegas do laboratório, Raquel, Tomas, Tatiane, Jessica, Pedro, Giovanni, Estela, Thaís, Lídia, Diogo, Heitor, Pabline, Carol, Kenny, Emanuel e Natalia, que sempre me apoiaram no que precisei no laboratório, de acordo com suas experiências.

Aos meus amigos da universidade, Rene, Oscar Javier, Natali, Fernanda, Sindy, Libia, por suas amizades e apoio nas disciplinas.

À Sra. Gladys, Ara e Pablo por todo o afeto que recebi durante minha estada em Campinas.

Ao meu amigo Oscar Castillo, por estar sempre me dando ânimos nos meus estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

À Universidade Estadual de Campinas por permitir realizar meus estudos de doutorado, a Embrapa por permitir realizar meu trabalho de pesquisa no Laboratório de Engenharia Genética (LEG), ao CNPq, pela concessão parcial financeiro do projeto. Ao Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) pela bolsa para realização dos meus estudos, e finalmente ao Instituto Nacional Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-México), por outorgarem a bolsa e a licença para estudar no Brasil.

## Resumo

A soja é uma das culturas economicamente mais importantes do mundo. Sua produção é afetada por diversas doenças fúngicas, como as causadas por *Fusarium spp* e *Sclerotinia sclerotiorum*, provocando perdas significativas no rendimento e na qualidade das sementes. As intervenções de manejo são limitadas, caras e associadas a problemas ambientais. A resistência do hospedeiro proporciona uma abordagem mais conveniente e econômica. O silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro (HIGS) tem demonstrado ser uma estratégia alternativa à resistência de fungos nas plantas. Foram geradas linhagens transgênicas de soja com uma construção do tipo intron-hairpin para expressar siRNAs correspondentes ao gene *CYP51B* de *Fusarium oxysporum*. Os resultados mostraram a presença de siRNA (correspondente ao gene *F. oxysporum CYP51B*) tanto nas folhas quanto nas raízes das linhas transgênicas. As plantas (geração T<sub>3</sub>) foram desafiadas contra *F. oxysporum*, *F. graminearum* e *S. sclerotiorum*. Agressividade da doença foi avaliada e revelou resistência ao *F. oxysporum* em a linhagem, denominada 3.22, que não apresentava sintomas e esta mesma linhagem apresentou a menor área de lesão na folha para o fungo de *S. sclerotiorum* 72 horas após inoculação. Além disso, as linhas transgênicas apresentaram melhor desenvolvimento da planta (altura e crescimento das raízes) quando comparadas com o controle (planta não transgênica). No entanto, as linhagens transgênicas revelaram um melhor desenvolvimento quando inoculadas com *F. graminearum*, *F. oxysporum* e tiveram a menor área de lesão nas folhas quando foram inoculadas com *S. sclerotiorum*.

**Palavras chave:** Silenciamento gênico, Fungos fitopatogênicos, *Glycine max*, Plantas transgênicas, HIGS.

## Abstract

Soybean is one of the most economically important crops in the world. Its production is affected by several fungal diseases, such as those caused by *Fusarium spp.*, and *Sclerotinia sclerotiorum*, causing significant losses in yield and seed quality. Management interventions are limited, expensive and associated with environmental problems. Host resistance provides a more convenient and cost-effective approach. Host induced gene silencing (HIGS) has been demonstrated to be an alternative strategy to engineer fungus resistance in plants. Transgenic soybean lines were generated with an intron-hairpin construction in order to express the siRNA corresponding to the *CYP51B* gene of *Fusarium oxysporum*. Results showed the presence of siRNA (corresponding to the *F. oxysporum CYP51B* gene) in both the leaves and roots of the transgenic lines. Plants (T<sub>3</sub> generation) were challenged against *F. oxysporum*, *F. graminearum* and *S. sclerotiorum*. Disease severity was evaluated and revealed resistance to *F. oxysporum* with a line, named 3.22, which presented no symptoms and this same lineage presents the smallest area of leaf damage for *S. sclerotiorum* fungus at 72 h after inoculation. In addition, transgenic lines presented better plant development (height and root growth) when compared to the non-transgenic line. Moreover, transgenic lines revealed a better development when inoculated with both *F. graminearum* and *F. oxysporum* and presented smallest area of injury on leaves when they were inoculated with *S. sclerotiorum*.

**Keywords:** Gene silencing, Phytopathogenic fungi, *Glycine max*, Transgenic plants, HIGS.



## Figuras

**Figura 1.** Mecanismo de ação de compostos antifúngicos afetando a rota Biosintética do ergosterol. Enzimas alvo à direita das setas com genes codificadores entre parênteses. Compostos antifúngicos à esquerda das setas. Setas indicam passos para a biossíntese do ergosterol. Adaptado de Lupetti et al., 2002.....21

**Figura 2.** Vetor pFoCYP51AHAS contendo o gene *CYP51* controlado pelo promotor AtACT2 e o gene de seleção *ahas* controlado pelo promotor 35SCaMV.....34

**Figura 3.** Avaliação de variáveis agronômicas em seis linhagens GM de soja que contém o gene *CYP51* e um controle inoculadas com o fungo *F. oxysporum* e *F. graminearum*. Linhagens com a mesma letra não apresentam diferenças significativas, Duncan 5%. ....44

**Figura 4.** Resposta da resistência das plantas transgênicas de soja inoculadas com *F. oxysporum*. Aos 10 e 15 dias após inoculação (a) transgênicos (b) não transgênico. (c) sintomas não observados nas plantas transgênicas da linha 3.22 aos 15 dias após inoculação. ....45

**Figura 5.** Engenharia de soja para expressar dsRNA para silenciar o gene *Fusarium CYP51*. (a) Diagrama representando do vetor (pFoCYP51AHAS) utilizado para transformar plantas de soja. Que contém um fragmento do gene *CYP51* de 502 pb de *F. oxysporum* que foi clonado na direção sense e anti-sence, flanqueando o intron do gene de *Flaveria trinervia pdk*, sob o controle do promotor *A. thaliana actin 2* (*AtACT2pro*) para a construção do cassete intron-hairpin RNAi ( $\Delta CYP51$ ). O vetor pFoCYP51AHAS também contém o gene *A. thaliana ahas* mutante (*AtAHAS*), sob o controle do promotor de RNA 35SCaMV (35Spro), que confere tolerância às imidazolinonas, usadas como seleção. *nos3'*: terminador do gene *nopaline synthase* de *A. tumefaciens*; 35St: Terminador do RNA do vírus do mosaico da couve-flor; LB: sequência da borda esquerda; RB: borda direita. (b) Análise de PCR realizada com os primers CYP51F e CYP51R confirmou a presença do cassete  $\Delta CYP51$  (seta) em seis linhas transgênicas. (c) Análise de *Northern blot* usando a sonda *CYP51* (fragmento amplificado por PCR) para detecção do siRNA correspondente  $\Delta CYP51$ . (d) Quantificação relativa do siRNA nas seis linhas transgênicas. O Controle é uma planta não-transgênica.....47

**Figura 6.** Ensaio histoquímico das plantas que foram inoculadas com os fungos *Fusarium sp.*, a, b folhas e pecíolos de planta transgênicas inoculadas com *F. oxysporum* e controle (folha de planta não transgênica); c, d, e, folhas e pecíolos de plantas transgênicas inoculadas com o fungo *F. graminearum* e controle (planta não transgênica).....48

**Figura 7.** Inoculação das folhas de soja GM e um controle (planta não GM) com o fungo de *S. sclerotiorum*. A) Detalhe das linhagens à resposta ao crescimento do micélio após 48h e 72h comparada à planta controle, demonstrando que a área

lesionada foi menor das linhagens transgênicas em comparação com o controle as 72 h. B) Avaliação da área de lesão em dois tempos 48 e 72 hs de seis linhagens GM de soja e um controle, linhagens com a mesma letra não apresentam diferenças significativas, Duncan 5%. ....51

**Figura 8.** Correlação entre as quantidades de siRNA nas raízes (a) e folhas (b) e a gravidade dos sintomas induzidos pelo *F. oxysporum* nas seis linhas de soja transgênica. Correlações de Pearson  $r = -0,89$  ( $p < 0,006$ ) e  $r = -0,83$  ( $p < 0,019$ ), respectivamente. Área cinza = 95% limites de confiança; linhas traçadas = 95% limites de previsão. ....52

**Figura 9.** Interação das linhagens com os três fungos, em relação ao nível de danos provocados pelos fungos. Fg= *F. graminearum*, Fo= *F. oxysporum*, Ss= *S. sclerotiorum*. ....53

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Resumo do silenciamento de gênico induzido pelo hospedeiro (HIGS) em plantas aplicadas a várias pragas agrícolas. As espécies de pragas, genes alvo e efeitos documentados são resumidos. ....	25
<b>Tabela 2.</b> Descrição dos iniciadores para amplificação do gene $\Delta CYP51$ , e as sequências de nucleotídeos, o tamanho dos amplicons gerados em pares de bases (pb).....	36
<b>Tabela 3.</b> Eficiência de transformação genética de plantas T <sub>0</sub> de soja BRS7980 via <i>A. tumefaciens</i> EHA 105, usando o protocolo de transformação de nós cotiledonares induzidos para organogênese .....	40
<b>Tabela 4.</b> Análise da segregação de 10 linhagens da geração T <sub>1</sub> . ....	41
<b>Tabela 5.</b> Quadrados médios da análise de variância geral de seis linhagens geneticamente modificadas (LGM) de soja e o controle (NGM), inoculadas com <i>F. oxysporum</i> . ....	42
<b>Tabela 6.</b> Quadrados médios da análise de variância geral de seis linhagens geneticamente modificadas (LGM) de soja e o controle (NGM), inoculadas com <i>F. graminearum</i> .....	43
<b>Tabela 7.</b> Quadrados médios da análise de variância geral de seis linhagens transgênicas (LGM) e um controle (LNGM) inoculadas com o fungo <i>Sclerotinia Sclerotiorum</i> pelo método de folha destacada .....	49
<b>Tabela 8.</b> Correlação Pearson de quatro variáveis agronômicas avaliadas em linhagens geneticamente modificadas (LGM) de soja inoculadas com o fungo <i>Fusarium oxysporum</i> . ....	52

## Sumario

Figuras .....	9
Lista de tabelas .....	11
1. Introdução .....	14
2. Revisão de literatura .....	16
2.1. <i>Fungos que causam doenças no cultivo de soja</i> .....	16
2.2. <i>Mecanismos de infecção dos fungos nas plantas</i> .....	17
2.3. <i>Alvo dos fungicidas</i> .....	19
2.4. <i>Silenciamento gênico em plantas</i> .....	21
2.5. <i>Silenciamento gênico por meio de HIGS</i> .....	23
2.6. <i>Mecanismos de transferência siRNA entre hospedeiro e patógeno fúngico</i> 30	
2.7. <i>Transformação genética de soja</i> .....	31
3. Justificativa .....	32
4. Objetivo geral .....	32
4.1. <i>Objetivos específicos</i> .....	32
5. Material e Métodos .....	33
5.1. <i>Vetor de interferência de RNA</i> .....	33
5.2. <i>Transformação de plantas de soja</i> .....	34
5.3. <i>Avaliação de plantas transformadas por PCR</i> .....	35
5.4. <i>Análise da progênie</i> .....	36
5.5. <i>Análise de Northern blot para detecção de siRNAs</i> .....	37
5.6. <i>Bioensaios</i> .....	37
5.6.1. <i>Método de inoculação de sementes com esporos</i> .....	37
5.6.2. <i>Ensaio histoquímico das LGM com Fusarium spp</i> .....	38
5.6.3. <i>Bioensaios de Sclerotinia sclerotiorum em folhas destacadas</i> .....	38
5.7. <i>Análises estatísticas</i> .....	39
6. Resultados .....	40
6.1. <i>Plantas de soja geneticamente modificadas</i> .....	40

6.2. Bioensaios de soja inoculadas com esporos de <i>Fusarium</i> .....	41
6.3. Bioensaio em folhas destacadas .....	48
6.4. Correlações .....	51
7. Discussão .....	54
8. Conclusão .....	59
9. Considerações finais e perspectivas .....	60
10. Bibliografia .....	61
Anexo 1. Bioética e biossegurança .....	76
Anexo 2. Artigo .....	77

## 1. Introdução

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é hoje a cultura mais importante do agronegócio brasileiro e mundial, pois somente em 2018 movimentou cerca de 31,7 bilhões de dólares (Agrostat, 2019). A soja é uma commodity que apresenta múltiplos usos devido ao seu elevado teor de proteínas (35-52%), assim como o conteúdo de óleo (14-24%) (Vollmann, 2016). De acordo com dados da CONAB de 2020, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, tendo na safra 2019/2020 alcançado 122, 2 milhões de toneladas, que foram cultivadas em 36,7 milhões de hectares, representando uma produtividade média nacional de 3,3 kg/ha.

A soja é afetada desde a emergência das plantas até a maturidade dos grãos por uma grande diversidade de microrganismos, principalmente fungos, que geralmente limitam o crescimento e o rendimento da cultura. A principal estratégia de manejo desses fungos fitopatogênicos está focada no uso de fungicidas, no entanto, esses também têm efeitos diretos sobre os seres humanos e o meio ambiente (Russo *et al.*, 2019).

Uma alternativa para a geração de plantas resistentes a fungos é o silenciamento gênico através da estratégia de RNA interferente a partir da utilização de metodologias eficientes de engenharia genética pelo desenho e construção do vetor a ser usado, assim como pela obtenção de plantas transgênicas via transformação genética (Tian *et al.*, 2016). Em 2010, o grupo do Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical (LEG/Embrapa/Cenargen) demonstrou pela primeira vez a transferência do sinal de silenciamento de uma planta transgênica para um fungo fitopatogênico (Tinoco *et al.*, 2010). O fenômeno de interferência *in vivo* no fungo patogênico *Fusarium verticillioides* no qual a expressão de um transgene marcador *gus* foi especificamente silenciado pela inoculação de células do micélio em plantas de *Nicotiana tabacum* geneticamente modificadas expressando pequenos RNAs de interferência (siRNA) a partir de um dsRNA correspondente ao gene exógeno *gus*. Este trabalho indicou que o sinal de silenciamento foi translocado das células vegetais através dos esporos germinados para as células do micélio do fungo (Tinoco *et al.*, 2010). Esta estratégia de defesa vegetal, definida como HIGS (Silenciamento Gênico Induzido pelo Hospedeiro) envolve a expressão de construções gênicas (vetores) e transformação genética do hospedeiro, gerando dsRNAs dirigidos para silenciar genes do patógeno.

Andrade *et al.* 2015 reportou em seu trabalho com transformação de plantas de *N. tabacum*, o silenciamento do gene da quitina sintase (*Chs*) do fungo que causa o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). O alvo escolhido foi o gene que codifica para *Chs*, que determina a síntese de quitina, um polissacarídeo que é componente estrutural crucial na parede celular de diversos fungos. Plantas de tabaco foram geneticamente transformadas com uma construção do tipo intron-hairpin para silenciamento gênico do fungo.

HIGS tem sido demonstrado em diversos patógenos fúngicos tais como em planta de cevada para silenciar o gene *GFT1* do fungo *Blumeria graminis*; em banana, para silenciar o gene *FTF1* do fungo *Fusarium oxysporum*; em trigo e *Arabidopsis thaliana*, para o gene *CYP51* do fungo *Fusarium graminearum*. Esses trabalhos demonstraram que esta técnica é eficiente para reduzir o crescimento do micélio e a infecção do fungo das plantas. Além disso, proporciona uma promissora alternativa de controle de doenças ao controle químico (Nowara *et al.*, 2010; Koch *et al.*, 2013, Ghag *et al.*, 2014).

Atualmente, a aplicação de fungicidas sistêmicos, como inibidores da desmetilação de esteróis (DMIs), é essencial para controlar as doenças de *Fusarium* spp. e assim, atingir o nível de produção desejável das cultivares modernas de alto rendimento. Os fungicidas DMI, como o tebuconazol, o triadimefon e o procloraz, atuam como inibidores da biossíntese do ergosterol devido à ligação da citocromo P450 lanosterol C-14 $\alpha$ -desmetilase (*CYP51*) ao citocromo P450, que posteriormente afeta a integridade da membrana fúngica (Yoshida, 1993). Devido à escassez de produtos químicos alternativos, os DMIs têm sido amplamente utilizados em campo desde sua descoberta na década de 1970. Portanto, não surpreende que a sensibilidade reduzida, ou mesmo a resistência a fungicidas DMIs tenham começado a se desenvolver em muitos fungos fitopatogênicos (Brent, 1995; Cools, 2008). A estratégia de utilizar o gene *CYP51*, essencial para a sobrevivência e infecção fúngica, estaria entre a melhor possível como alvo de RNAi para reduzir o desenvolvimento de resistência a doenças fúngicas nas plantas (Koch *et al.*, 2013). Dessa forma, o principal objetivo deste trabalho foi obter linhagens de soja resistentes a fungos fitopatogênicos pela transformação genética, mediante a utilização da estratégia do silenciamento gênico induzido por hospedeiro (HIGS), usando um vetor para engenharia genética com o gene *CYP51* em grampo para expressar siRNAs nas plantas.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1. Fungos que causam doenças no cultivo de soja

Uma das principais doenças que afeta a soja é a fusariose, que é causada pelo fungo (Broders *et al.*, 2007; Ellis *et al.* 2011) de solo de um complexo de espécies *Fusarium solani*. (Aoki *et al.*, 2003). Os fungos afetam a cultura da soja em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, e podem causar queda total das vagens ou deterioração total das sementes, causando perdas consideráveis. Maiores perdas do rendimento causadas pelos fungos acontecem durante os estádios da floração plena (R<sub>2</sub>) ao início da formação de vagens (R<sub>3</sub>/R<sub>4</sub>) da planta, e as características são sementes com manchas deprimidas de coloração castanha-escura a negra (Almeida *et al.*, 2005).

A proliferação de fungos depende muito da disposição do terreno e do volume de chuvas durante o cultivo de soja (Liu *et al.*, 2015). Entretanto, durante a estação das chuvas, a exposição da soja não colhida à umidade contínua e por muito tempo promove o crescimento de fungos no campo, que além da umidade sempre são submetidos a elevadas temperaturas, e se propagam rapidamente, reduzindo o rendimento e a qualidade dos grãos (Deng *et al.* 2015); assim como, na alteração dos metabólitos primários no fruto, incluindo óleos, proteínas e ácidos graxos, alterando também a biossíntese de metabólitos secundários, como isoflavonas, tocoferol e ácido fenólico (Gutierrez-Gonzalez *et al.*, 2010; Chennupati *et al.*, 2011).

*Fusarium* spp. provocam doenças em diversas partes da planta que influenciam negativamente na produção da soja plantada nos oito principais países produtores. A síndrome da morte súbita (SDS) da soja ocorre com frequência (Wrather *et al.*, 2010), e é causada na América do Norte pela espécie *Fusarium virguliforme* (Aoki *et al.*, 2003). Na América do Sul, a doença pode ser causada por várias espécies diferentes de *Fusarium* incluindo *F. brasiliense*, *F. cuneirostrum*, *F. tucumaniae*, *F. virguliforme* e recentemente, *F. crassistipitatum* (O'Donnell *et al.*, 2010; Aoki *et al.*, 2012). Essas doenças são mais graves quando a semeadura da soja é realizada precocemente, e em condições de umidade e temperatura favoráveis para o patógeno.

Outro fungo que afeta a cultura da soja é *Sclerotinia sclerotiorum* que provoca doença no caule da planta. O manejo da doença é complicado devido à sobrevivência a longo prazo das estruturas de sobrevivência do fungo no solo, e pela ausência de resistência nas cultivares comerciais. Além disso, o ciclo de vida de *S. sclerotiorum*



nos campos de soja é altamente dependente das condições climáticas, levando a uma ocorrência altamente esporádica da doença ao longo das estações e a uma distribuição agregada dentro dos campos (Willbur *et al.*, 2019).

Uma característica chave deste patógeno é a sua capacidade de produzir estruturas de reprodução e resistência negras conhecidas como escleródios, e crescimentos brancos de micélio nas plantas infectadas. O esclerócio é uma agregação de hifas formando uma casca exterior preta com várias camadas de células melanizadas importantes na sua proteção contra condições adversas e degradação microbiana (Bell *et al.*, 1986; Henson *et al.*, 1999). Assim, os escleródios desempenham importante papel no ciclo da doença, sendo as principais estruturas de sobrevivência a longo prazo (Willetts *et al.*, 1980).

O mofo branco de soja, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* é atualmente considerado a segunda doença mais importante devido à perda de produtividade da soja (Zhao *et al.*, 2015). Para a cultura da soja, a fase mais vulnerável à infecção vai R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub> (Danielson *et al.*, 2004).

O uso de fungicidas Azóis por décadas tem levado ao surgimento de cepas com sensibilidade reduzida ou mesmo resistência em vários patógenos fúngicos de plantas, devido ao uso excessivamente desde sua descoberta (Tian *et al.*, 2019). Essa informação reforça a necessidade de estratégias eficientes para o controle de fitopatógenos.

## 2.2. Mecanismos de infecção dos fungos nas plantas.

A interação de um patógeno com um hospedeiro é caracterizada por uma série de eventos sequenciais chamados de ciclo da doença que resultam no desenvolvimento e perpetuação da doença (Daly, 1984). Um ciclo geral de doença compreende as seguintes fases: (1) Disseminação e contato em que os fungos se espalham e entram em contato com uma planta hospedeira apropriada por mecanismos ambientais como vento, água, insetos ou por crescimento ativo como alguns fungos que infectam as raízes (Travadon *et al.* 2012), (2) pré-penetração, incluindo germinação de esporos, ligação de patógenos às estruturas do hospedeiro e eventos de reconhecimento que são acionados por sinais do hospedeiro, bem como fatores ambientais (Tucker e Talbot, 2001), (3) entrada de patógenos na planta através de aberturas naturais, feridas ou por penetração direta que pode envolver estruturas de penetração especializadas, como apressórios (Pryce-Jones, 1999) ou através de

feridas causadas por insetos (Diguistini *et al.*, 2011), (4) infecção e invasão em que o patógeno estabelece contato com células hospedeiras e pode se espalhar de célula em célula, resultando em sintomas visíveis, (5) reprodução em que um número imenso de esporos de fungos são produzidos a partir de tecidos infectados do hospedeiro, (6) disseminação de esporos do local de reprodução para outras superfícies de hospedeiros suscetíveis ou novas plantas e (7) dormência, ajudando o patógeno a sobreviver em condições desfavoráveis (Brown e Ogle, 1997).

*Fusarium oxysporum* infecta as plantas mediante esporos presentes no solo que germinam em resposta aos sinais do hospedeiro e diferenciam-se em hifas de infecção, que se aderem às raízes da planta e as penetram diretamente, sem a necessidade de estruturas de infecção especializadas. A penetração da raiz parece ocorrer predominantemente através de aberturas naturais nas junções intercelulares das células corticais ou através de feridas (Perez-Nadales e Di Pietro, 2011), e uma vez dentro da raiz, as hifas crescem inter e intracelularmente para invadir o córtex e cruzar a endoderme, até atingir os vasos do xilema. O fungo então usa o xilema como um duto para colonizar o hospedeiro.

*F. graminearum* pode entrar pelas flores das plantas passivamente, através de aberturas naturais, tais como estômatos (Bushnell, 2001), ou ativamente através de penetração direta. Em gramíneas, suas hifas frequentemente se estendem na abertura apical das flores (Bushnell, 2001; Lewandowski *et al.*, 2006), ou fissuras entre lemma e pálea adjacentes (Lewandowski *et al.*, 2006). Uma rota ativa para entrada de patógenos *Fusarium* é por meio da penetração da cutícula, epiderme e da parede celular com hifas de infecção curta (Wanjiru *et al.*, 2002). A penetração no tecido do hospedeiro é provavelmente facilitada pela vasta gama de enzimas hidrolisantes secretadas por *Fusarium*.

*S. sclerotiorum* é um patógeno altamente prejudicial com diversos modos de infecção e um estilo de vida de alimentação dupla de biotrófico e necrotrófico (Kabbge *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019). Ele ataca as plantas hospedeiras por meio de ascósporos que são levados pelo ar a diversas partes das plantas, por micélios originados de tecidos infectados e de escleródios germinados (Willetts *et al.*, 1980). Um estudo citológico em *Phaseolus* spp revelou que o fungo penetra no hospedeiro subcuticularmente seguido por hábitos de crescimento intercelular (Tariq e Jeffries, 1986; Jamaux *et al.*, 1995; Garg *et al.*, 2010). Quando os ascósporos pousam no tecido suscetível do hospedeiro, eles podem germinar em condições favoráveis e

iniciar um novo ciclo de infecção. Em condições úmidas e frias, este fungo cresce rapidamente dentro dos tecidos infectados do hospedeiro e desenvolve sintomas de escurecimento, amolecimento dos tecidos e um micélio branco parecido com algodão, que leva à necrose, retardo de crescimento, amadurecimento prematuro e murcha do hospedeiro (Willetts *et al.*, 1980). Portanto, as doenças que ele causa receberam nomes, incluindo podridão do caule, gota, podridão da coroa, podridão do algodão, podridão mole aquosa, ferrugem das flores e ferrugem da *Sclerotinia*. Ao matar o hospedeiro, o fungo pode crescer saprofiticamente no tecido da planta morta. Os escleródios são posteriormente formados abundantemente na superfície e cavidades do hospedeiro, em restos de plantas e no solo, onde são capazes de permanecer dormentes por até 10 anos (Harper *et al.*, 2002).

### 2.3. Alvo dos fungicidas

Choi *et al.* (2014) mencionaram que o alvo dos fungicidas são as enzimas das superfamílias das monooxigenases *P450* (CYPs), que estão envolvidas em diversos processos celulares, principalmente no metabolismo primário do fungo.

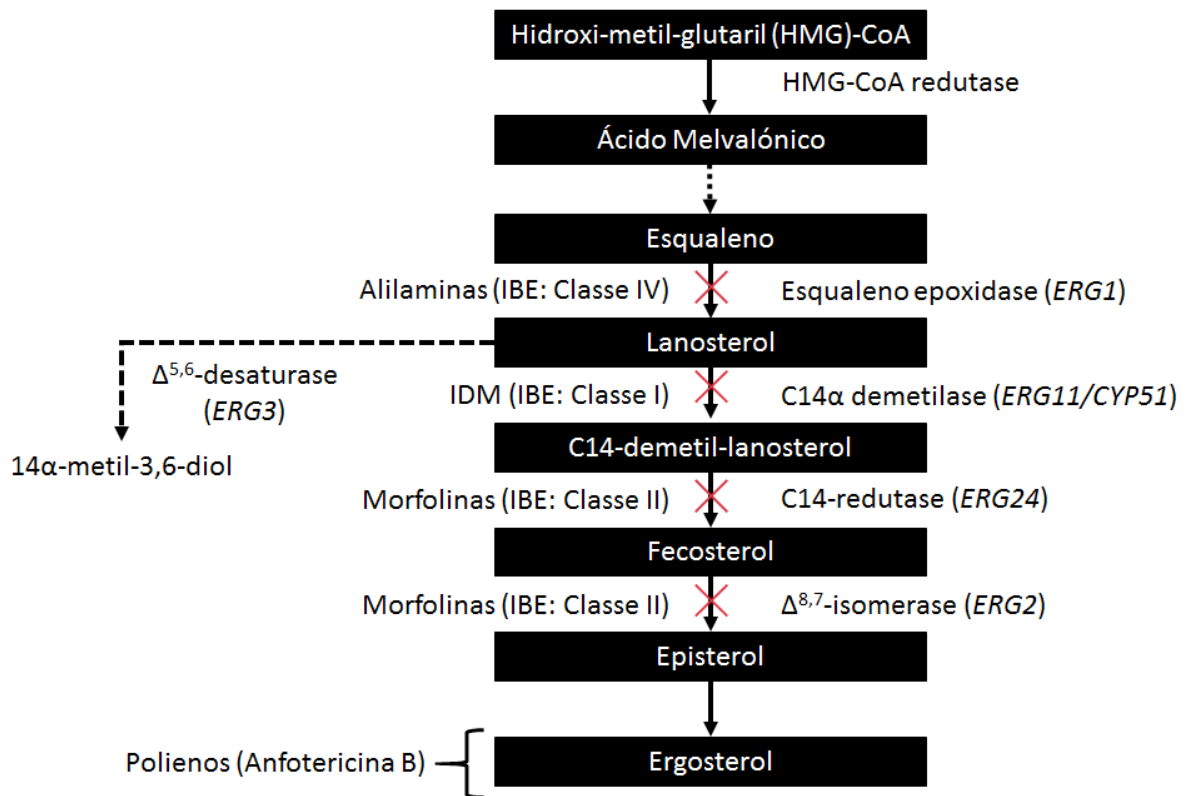
Em fungos, o ergosterol é o principal esterol da membrana plasmática, sendo responsável pela manutenção da fluidez e da estabilidade da membrana (Parks e Casey, 1995). Quando ocorre a inibição da C14  $\alpha$ -desmetilase (enzima CYP51), há depleção do ergosterol e o acúmulo do precursor 14 $\alpha$ -metilado, ocasionando mudanças na estrutura da membrana plasmática e tornando-se mais vulnerável a vários danos, além de influenciar a atividade de muitas enzimas de membrana (Lupetti *et al.*, 2002). Dado que o ergosterol se encontra ausente nas plantas, é o alvo principal a ser explorado no desenvolvimento dos produtos antifúngicos.

Inibidores específicos das monooxigenases são conceituados como importantes componentes antifúngicos, uma vez que inibem seletivamente as enzimas do fungo. Um bom exemplo é o grupo de fungicidas inibidores da desmetilação (DMIs), que possui como modo de ação a inibição da biossíntese de esteroides. Os azóis inibem a síntese de ergosterol, pela inibição de citocromo P450. Portanto, a enzima CYP51 é alvo dos DMIs, sendo que a atividade fúngica dos assoles é devida a sua grande afinidade por *P450* dos fungos (Sheehan *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2014). Quando a síntese de ergosterol não ocorre completamente, o crescimento e proliferação do fungo pode ser interrompido, causando a morte do mesmo.

Os inibidores da biossíntese do esterol utilizados na agricultura têm como modo de ação a inibição da rota sintética de esteróis, e em fungos cada classe de fungicidas distingue-se quanto aos sítios específicos de ação (Oliver e Hewitt, 2014). Particularmente, os inibidores da desmetilação têm como sítio específico de ação a enzima C14 $\alpha$ -desmetilase (enzima CYP51) do citocromo P450, que catalisa processos oxidativos necessários na formação do ergosterol (Shapiro *et al.*, 2011; Oliver e Hewitt, 2014). A redução do ergosterol e acúmulo de seus precursores foram observados em *M. fructigena* tratada com inibidores da biossíntese do esterol (Kato *et al.*, 1975).

Em *M. fructicola*, C14 $\alpha$  desmetilase é codificada pelo gene CYP51 (Luo e Schnabel, 2008a) e desencadeia três oxidações sucessivas a partir da remoção do grupo metila (CH<sub>3</sub>) da molécula C14 do lanosterol (Reis *et al.*, 2010).

Os fungicidas azóis inibidores da C14 $\alpha$  desmetilase, agem através de um átomo livre de nitrogênio localizado no anel heterocíclico N-2 (imidazol) ou N-3 (triazol) que se liga ao átomo de ferro-hêmico da enzima do citocromo P450 inibindo o acesso aos substratos necessários para sua função (Kelly e Kelly, 2013; Oliver e Hewitt, 2014). A partir desta inibição, ocorre um acúmulo de esteróis tóxicos do grupo 14 $\alpha$ -metilo (lanosterol e 14 $\alpha$ -metil3-6-diol), produzidos pela  $\Delta$ -5,6-desaturase, interferindo com as funções do ergosterol como componente predominante da membrana celular (Gadher *et al.*, 1983; Lupetti *et al.*, 2002) (Figura 1). Sendo assim, o estresse causado na membrana da célula resulta no aumento de sua permeabilidade, causando o extravasamento de conteúdos intracelulares e consequentemente, limitando o crescimento fúngico (Buchenauer, 1987; Lupetti *et al.*, 2002; Reis *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Mecanismo de ação de compostos antifúngicos afetando a rota Biossintética do ergosterol. Enzimas alvo à direita das setas com genes codificadores entre parênteses. Compostos antifúngicos à esquerda das setas. Setas indicam passos para a biossíntese do ergosterol. Adaptado de Lupetti *et al.*, 2002.

#### 2.4. Silenciamento gênico em plantas

O melhoramento genético incrementa o rendimento ou a produtividade, assim como a resistência aos agentes abióticos e bióticos adversos, através da incorporação de genes desejáveis que modificam o genótipo das plantas por meio do melhoramento genético tradicional ou por ferramentas biotecnológicas. O melhoramento genético através da transformação genética ocorre a partir da incorporação dos genes que codificam a expressão de outras características na planta transformada, tais como resistência a doenças provocadas pelos fungos.

As tecnologias de silenciamento de RNA, particularmente a tecnologia de inserção de construções do tipo intron-hairpin (hpRNA), e mais recentemente a tecnologia de amiRNA, têm sido amplamente utilizadas para estudar a função genética, gerar resistência a patógenos, pragas e melhorar outras características

agronômicas, manipulando a expressão de genes de vias metabólicas em vários modelos e espécies de plantas cultivadas (Guo *et al.*, 2016).

O silenciamento por interferência de RNA (RNAi) é um mecanismo evolutivamente conservado em eucariotos. É induzido por RNA de cadeia dupla (dsRNA) ou RNA estruturado em hairpin (hpRNA), envolvendo fatores comuns, incluindo as proteínas da família Dicer ou Dicer-like (DCL) e Argonaute (AGO) (Baulcombe, 2004; Eamens *et al.*, 2008). Na via de silenciamento de RNA básico, dsRNA ou hpRNA é processado por uma proteína Dicer ou DCL em pequenos RNA (sRNA) duplex de 20-24 nucleotídeos (nt) com saliências de 2 nt em ambas as extremidades de 3'. Uma cadeia dos RNAi duplex é incorporada a um complexo silenciador induzido por RNA (RISC). A molécula de sRNA guia o complexo RISC para a região complementar do RNA de fita simples alvo, e uma das proteínas da família AGO então cliva o RNA nos nucleotídeos correspondentes à região central (geralmente nt. 10-11) (Baulcombe, 2004; Eamens *et al.*, 2008).

O silenciamento dos siRNA é um mecanismo regulador do gene que limita o nível de transcrição através da ativação de um processo de degradação do RNA específico da sequência (silenciamento do gene pós-transcricional [PTGS]/Interferência do RNAi). Este mecanismo único tem sido descoberto independentemente e estudado em diferentes classes de eucariotas como silenciamento genético pós-transcricional em plantas (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990). Fenômeno semelhante foi relatado no fungo *N. crassa*, no qual foi denominado quelling (Cogoni *et al.*, 1996; Romano e Macino, 1992).

No entanto, os sinais do silenciamento dos pequenos RNAs de interferência (siRNA) não ficam restritos à célula em que são gerados, causando assim silenciamento in trans, ou seja, estes sinais são passados de forma sistêmica para outros organismos ou células alvo. Vários estudos confirmaram a previsão de que os sinais de silenciamento induzidos por transgene, como o silenciamento induzido por vírus, poderiam viajar sistemicamente através da planta para induzir o silenciamento a longas distâncias. Um fenótipo de silenciamento foi observado nas folhas superiores de plantas de *N. benthamiana* expressando estavelmente o gene que codifica para GFP após uma indução transitória de silenciamento de GFP em folhas inferiores pela infiltração de *Agrobacterium* (Voinnet e Baulcombe, 1997).

Desde a descoberta do silenciamento do gene induzido por dsRNA em 1998 (Waterhouse *et al.*, 1998; Fire *et al.*, 1998) e subsequente elucidação das várias vias

de RNAi em plantas, um número de transgenes ou tecnologias silenciadoras baseadas em vírus foram desenvolvidas para induzir artificialmente o silenciamento de RNA em plantas.

### 2.5. Silenciamento gênico por meio de HIGS

As plantas naturalmente desenvolveram um sistema imunológico, baseado no mecanismo de silenciamento mediado por RNA para se defender contra vírus invasores (Csorba *et al.*, 2009; Harvey *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2011; Muhammad *et al.*, 2019). Esta característica tem sido utilizada para desenvolver a tecnologia de silenciamento gênico induzida pelo hospedeiro (HIGS) para controlar outros patógenos de plantas (Guozhong *et al.*, 2006). O HIGS é um desenvolvimento posterior do silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) (Harvey *et al.*, 2011), que permite o silenciamento de genes em patógenos de plantas, expressando uma construção de RNAi contra genes específicos endógenos ao patógeno, na planta hospedeira.

O HIGS é um processo baseado em RNAi onde pequenos RNAs produzidos na planta silenciam os genes das pragas ou patógenos que atacam as plantas. Os pequenos RNAs são geralmente produzidos pela produção de RNA de cadeia dupla (dsRNA) em plantas transgênicas, mas para fins experimentais, o dsRNA pode ser introduzido nas células vegetais com *Agrobacterium* ou vírus que se replicam via RNA de dupla fita. Diversos trabalhos têm demonstrado a capacidade de deslocamento do silenciamento, e a eficiência do silenciamento *in trans*. Além disso, demonstrou-se que o siRNA produzido na planta pode gerar silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro (HIGS – “Host-Induced Gene Silencing”) em células de fungos.

O primeiro exemplo bem-sucedido de HIGS para pragas não virais foi relatado em *Arabidopsis*, onde a expressão de RNAs *hairpin* específicos induziu o silenciamento de um gene que codifica um peptídeo secretor em nematóides de galha (*Meloidogyne spp.*) e resultou em resistência à doença (Huang *et al.*, 2006). Os dsRNAs projetados para direcionar um gene do citocromo P450 na lagarta do algodão (*Helicoverpa armigera*) e um gene de uma ATPase vacuolar em coleópteros também reduziram significativamente a infestação desses insetos no algodão (Baum *et al.*, 2007) e no milho (*Zea mays*) (Mao *et al.*, 2007).

Tinoco *et al.*, 2010 reportaram em um trabalho mediante HIGS em plantas de tabaco transgênicas, que expressavam o gene *gus*, foram re-tranformadas com um cassete  $\Delta gus$ , as plantas re-tranformadas foram inoculadas com o fungo de *Fusarium verticillioides*, observaram que os esporos germinados permaneceram na superfície foliares e não causaram danos nos tecidos das folhas.

Por sua parte Andrade *et al.* 2015, mediante à estratégia de HIGS, em plantas de tabaco demonstrou a resistência à doença e silenciamento do gene *chs* e observam uma correlação positiva com a presença de siRNAs detectáveis em linhagens transgênicas. Demonstrou-se que genes endógenos do fungo necrotrófico *S. sclerotiorum* pode ser silenciado induzido pelo hospedeiro.

HIGS foi provado com sucesso na cevada e no trigo expressando dsRNA que teve como alvo o gene efector *Avra10* do fungo patogênico *Blumeria graminis* (Nowara *et al.*, 2010; Pliego *et al.*, 2013).

Também foi reportado em outros trabalhos às estratégias para o silenciamento gênico que utilizaram o princípio de RNA interferente, tendo como diferença básica a forma da indução do silenciamento. Foi eficiente para o knockdown gênico de importantes patógenos de plantas, como *Blumeria graminis* (Nowara *et al.*, 2010) e *Fusarium spp.* (Cheng *et al.*, 2015).



**Tabela 1.** Resumo do silenciamento de gênico induzido pelo hospedeiro (HIGS) em plantas aplicadas a várias pragas agrícolas. As espécies de pragas, genes alvo e efeitos documentados são resumidos.

Fungos e oomicetos				
Espécies	Hospedeiro	Nome do gene alvo	Efeito	Referências
<i>Blumeria graminis f. sp. tritici</i>	<i>Triticum aestivum</i>	MLO	Resistência	Riechen, 2007
<i>Phytophthora parasitica var. nicotianae</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	GST	Resistência; regulador negativa na resposta de defesa do GST	Hernández <i>et al.</i> , 2009
<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	GUS	Silenciamento <i>GUS</i> ; prova de conceito	Tinoco <i>et al.</i> , 2010
<i>Blumeria graminis</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Avra10</i>	Redução do desenvolvimento fúngico na ausência do gene de resistência correspondente <i>Mla10</i>	Nowara <i>et al.</i> , 2010
<i>Puccinia striiformis f. sp. tritici</i> or <i>P. graminis f. sp. tritici</i>	<i>Hordeum vulgare</i> , <i>Triticum aestivum</i>	<i>PSTha12J12</i>	Sem reduções óbvias no desenvolvimento de ferrugem ou esporulação	Yin <i>et al.</i> , 2011
<i>P. triticina</i> , <i>P. graminis</i> , <i>P. striiformis</i>	<i>Triticum aestivum</i>	<i>PtMAPK1</i> , <i>PtCYC1</i> , <i>PtCNB</i>	Supressão de doenças, impedindo o crescimento e a esporulação de fungos	Panwar <i>et al.</i> , 2013
<i>Blumeria graminis f. sp. hordei</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>BEC1005</i> , <i>BEC1019</i> , <i>BEC1054</i> , <i>BEC1011</i> , <i>BEC1016</i> , <i>BEC1018</i> , <i>BEC1040</i>	Interferência especificamente com a morte de células hospedeiras induzidas por patógenos	Pliego <i>et al.</i> , 2013
<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>CYP51A</i> , <i>CYP51B</i> , <i>CYP51C</i>	Resistência	Koch <i>et al.</i> , 2013
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Chs</i>	Redução da doença	Andrade <i>et al.</i> , 2015

<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Triticum</i>	<i>Chs3b</i>	Resistência em plantas cultivadas em condições de teste de campo.	Cheng <i>et al.</i> , 2015
<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>PiGPB1</i>	Redução de doença	Jahan <i>et al.</i> , 2015
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Zea mays</i>	<i>aflR</i>	Redução de toxinas do fungo	Masanga <i>et al.</i> , 2015
<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Triticum</i>	<i>FcFgl1, FcChsV, FcFmk1, FcGls1</i>	aberracao nas hifas do fungo	Chen <i>et al.</i> , 2016
<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>MoABC1, MoMAC1, MoPMK1</i>	inivção da doença na planta hospedeira	Zhu <i>et al.</i> , 2017a
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Zea mays</i>	<i>aflC</i>	Resistencia aflotixinas do fungo	Thakare <i>et al.</i> , 2017
<i>Puccinia striiformis f. sp. tritici</i>	<i>Triticum aestivum</i>	<i>PsFUZ7</i>	Regula a infecção e o desenvolvimento de <i>Pst</i>	Zhu <i>et al.</i> , 2017b
<i>Verticillium dahlia</i>	<i>Arabidopsis thaliana, Solanum lycopersicum</i>	<i>Ave1, Sge1, NLP1</i>	Redução de doença	Song e Thomma, 2018
<i>Puccinia striiformis f. sp. tritici</i>	<i>Triticum aestivum</i>	<i>PsCPK1</i>	Redução significativa no comprimento das hifas de infecção e no fenótipo da doença	Qi <i>et al.</i> , 2018
<i>Puccinia triticina</i>	<i>Triticum aestivum</i>	<i>PtMAPK1, PtCYC1</i>	Supressão de doenças, comprometendo o crescimento fúngico e a esporulação	Panwar <i>et al.</i> , 2018
<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>MoAP1</i>	Reduções comercializadas no crescimento de hifas aéreas, ramificação micelial e perda de conidiação do fungo	Guo <i>et al.</i> , 2019

<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Babana</i>	ERG11A, ERG11B, ERG11C; ERG6A, ERG6B	Resistencia	Dou <i>et al.</i> , 2019
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Zea mays</i>	<i>amy1</i>	Diminuição da colonização fúngica e acúmulo de aflatoxina nos grãos	Gilbert <i>et al.</i> , 2018
<b>Insetos</b>				
<i>Diabrotica virgifera</i>	<i>Zea mays</i>	V-ATPase A	Reduções visíveis nos danos radiculares	Baum <i>et al.</i> , 2007
<i>Helicoverpa armigera</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i> e <i>Arabidopsis thaliana</i>	CYP6AE14	Supressão da expressão CYP6AE14 e redução do crescimento em gossipol contido na dieta	Mao <i>et al.</i> , 2007
<i>Myzus persicae</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i> e <i>Arabidopsis thaliana</i>	Rack1, MpC002	<i>M. persicae</i> silenciada produziu menos descendência	Pitino <i>et al.</i> , 2011
<i>Nilaparvata lugens</i>	<i>Oryza sativa</i> L.	NIHT1, Nlcar, Nltry	Redução de transcrições de genes alvo no meio do intestino; não foram observados efeitos mortais fenotípicos após a transmissão de dsRNA	Zha <i>et al.</i> , 2011
<i>Helicoverpa armigera</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	CYP9A14	Reduziu a tolerância das larvas ao inseticida deltamethrin	Tao <i>et al.</i> , 2012
<i>Helicoverpa armigera</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	EcR	Resistência à <i>H. armigera</i> ; EcR dsRNA também confere resistência a outra praga lepidóptera, <i>Spodoptera exigua</i>	Zhu <i>et al.</i> , 2012
<i>Helicoverpa armigera</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	CYP6AE14, GhCP1	Plantas de algodão co-expressoras de dsRNA e cisteína protease exibem maior resistência a bollwormes	Mao <i>et al.</i> , 2013

<i>Helicoverpa armigera</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>HaHR3</i>	Deformidade de desenvolvimento e letalidade das larvas	Xiong <i>et al.</i> , 2013
<i>Sitobion avenae</i>	<i>Triticum aestivum</i>	<i>CbE E4</i>	Redução da produção de progenitores e resistência reduzida a inseticidas phoxim	Xu <i>et al.</i> , 2014
<b>Nematoides e parasitos</b>				
<i>Meloidogyne</i> species: <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. arenaria</i> , and <i>M. hapla</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	16D10	Resistência efetiva contra as quatro principais espécies de RKN	Huang <i>et al.</i> , 2006
<i>Heterodera glycines</i>	<i>Glycine max</i>	<i>MSP</i>	Desenvolvimento de fêmeas SCN e número de ovos por cisto foram reduzidos	Steeves <i>et al.</i> , 2006
<i>Meloidogyne javanica</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>MjTis11</i>	A regulamentação do <i>MjTis11</i> não resultou em um fenótipo letal	Fairbairn <i>et al.</i> , 2007
<i>Heterodera schachtii</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>B05, 4G06, 8H07, 10A06</i>	Redução do número de fêmeas maduras	Sindhu <i>et al.</i> , 2009
<i>Heterodera glycines</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Cpn-1, Y25, Prp-17</i>	Supressão comparável à resistência convencional	Li <i>et al.</i> , 2010
<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Mi-Rpn7</i>	Menor motilidade e infecção; nenhuma resistência completa	Niu <i>et al.</i> , 2012
<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>flp-14, flp-18</i>	50%-80% de redução na infecção	Papolu <i>et al.</i> , 2013
<i>Pratylenchus vulnus</i>	<i>Juglans regia</i>	<i>Pv010</i>	Redução da infecção por nematoides	Walawage <i>et al.</i> , 2013
<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Vitis vinifera</i>	16D10	Menor suscetibilidade	Yang <i>et al.</i> , 2013

<i>Heterodera glycines</i>	<i>Glycine max</i>	<i>HgALD</i>	Diminuição do número de fêmeas maduras de SCN	Youssef <i>et al.</i> , 2013
<i>Heterodera glycines</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Mi8D05</i>	Até 90% de redução na infecção por <i>M. incognita</i>	Xue <i>et al.</i> , 2013
<b>Plantas parasitas</b>				
<i>Triphysaria versicolor</i>	<i>Lactuca sativa</i> , <i>Triphysaria</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>GUS</i>	Silenciamento <i>GUS</i> ; prova de conceito	Tomilov <i>et al.</i> , 2008
<i>Orobanchae aegyptiaca</i> (broomrape)	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>M6PR</i>	Aumento significativo na porcentagem de tubérculos mortos de <i>O. aegyptiaca</i> nas plantas transgênicas de tomate	Aly <i>et al.</i> , 2009
<i>Cuscuta pentagona</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>STM</i>	O silenciamento impede o crescimento da cuscuta	Alakonya <i>et al.</i> , 2012
<b>Bactéria</b>				
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> e <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>iaaM</i> e <i>ipt</i>	Plantas transformadas são suscetíveis à transformação de <i>Agrobacterium</i> , mas são altamente resistentes à tumorigenese.	Escobar <i>et al.</i> , 2001
	<i>Juglans regia</i>	<i>iaaM</i> e <i>ipt</i>	Controle de galos da coroa	Walawage <i>et al.</i> , 2013

## 2.6. *Mecanismos de transferência siRNA entre hospedeiro e patógeno fúngico*

A extensão e a longevidade da regulação negativa de genes fúngicos por RNAi induzido pela planta hospedeira depende de vários fatores, incluindo a absorção eficiente de siRNAs pelo fungo, meia-vida de siRNAs e se os sinais de siRNA podem ser amplificados pelo fungo. Vários estudos utilizando siRNAs fluorescentemente marcados mostraram captação significativa de siRNAs por fungos (Khatri e Rajam, 2007; Joch *et al.*, 2009).

No entanto, o mecanismo exato pelo qual os RNAs exógenos entram na célula fúngica não é totalmente compreendido. O movimento do RNA entre o hospedeiro da planta e o patógeno invasor representa uma fase importante do HIGS mediado por RNAi e, embora pouco se saiba sobre o mecanismo de transporte de RNA entre espécies, este aspecto do HIGS provavelmente é importante no controle de fungos fitopatogênicos. Dois principais mecanismos relacionados à captação de RNA derivada do hospedeiro por fungos foram postulados: (1) captação de siRNAs via vesículas extracelulares (VEs) derivadas de plantas, e (2) captação ativa via transportadores localizados na membrana plasmática (Majumdar *et al.*, 2017).

Em fungos, o transporte mediado por vesículas de siRNAs tem sido descrito em vários estudos (Haag *et al.*, 2015). VEs de origem fúngica são internalizados por células hospedeiras através de endocitose ou intervenção de proteínas fusogênicas extracelulares (Knip *et al.*, 2014).

A transferência mediada por vesículas de siRNAs vegetais para fungos através de uma via exossômica é postulada com base nas evidências coletadas de vários estudos (Valadi *et al.*, 2007; Nowara *et al.*, 2010; Knip *et al.*, 2014; Han e Luan, 2015). As vesículas liberadas pelas células vegetais têm geralmente entre 100 e 400 nm de diâmetro e são portadoras de macromoléculas, como RNAs, proteínas e lipídios (Ju *et al.*, 2013; Mu *et al.*, 2014). Vários estudos apoiam a presença de vesículas semelhantes a exossomos nas plantas e seu papel no fornecimento de moléculas bioativas (Mu *et al.*, 2014; Raimondo *et al.*, 2015). Atualmente, não se sabe se outros mecanismos, além da transferência mediada por vesículas, contribuem significativamente para a transferência de RNAs de plantas para fungos patogênicos. Transporte molecular em plantas pode ocorrer plasticamente através de canais que ligam células adjacentes chamados plasmodesmos ou neoplasia através de um

processo que envolve a transferência através da membrana celular, as paredes celulares e espaços intercelulares (Melnik *et al.*, 2011).

## 2.7. Transformação genética de soja

A transformação da soja foi relatada pela primeira vez em 1988 (Christou *et al.*, 1988; Hinchey *et al.*, 1988). Mesmo depois de mais de duas décadas, a transformação estável da soja ainda não pode ser considerada rotineira na maioria dos laboratórios porque depende da capacidade de combinar técnicas eficientes de transformação e regeneração. Dois métodos foram utilizados com sucesso relativamente maior para produzir plantas completamente e estavelmente transformadas: bombardeamento de partículas e o sistema mediado por *Agrobacterium tumefaciens*.

Segundo Somers *et al.* (2003) existem três requisitos principais para estabelecer um sistema de transformação eficiente: (a) uma fonte de células totipotentes que servem como receptores do DNA recebido, (b) um meio de distribuição DNA nas células-alvo, e (c) um sistema para selecionar ou identificar as células transformadas.

*Agrobacterium* é uma bactéria fitopatogênica Gram-negativa, que infecta naturalmente plantas diferentes (De Cleene e De Ley, 1976). Esses fitopatógenos causam uma variedade de neoplasias, incluindo doença da galha da coroa (*A. tumefaciens* e *A. vitis*), doença da raiz pilosa (*A. rhizogenes*) e doença da galha da cana (*A. rubi*) em numerosas espécies de plantas (Gelvin, 2010a). A origem dessas doenças é a transferência horizontal de genes na região intersexual. O processo de transformação genética de plantas mediado por *A. tumefaciens* requer a presença de dos componentes genéticos localizados no plasmídeo Ti bacteriano. A transferência e a integração do T-DNA são determinadas por vários genes localizados no cromossoma bacteriano; pelo conjunto de genes de virulência (os genes *vir*) localizados no plasmídeo Ti ou Ri e pelas bordas que delimitam o T-DNA. O sistema de infecção das agrobactérias representa um elemento genético contendo informações complexas que permite a transferência de genes de um organismo procarioto para um eucarioto superior (Gelvin, 2003). Este processo de transferência de genes foi revisado por Tinoco *et al.* (2010); Gelvin (2010a, b); Pitzschke e Hirt (2010); Andrade *et al.* (2015).

### 3. Justificativa

A soja é atualmente uma das principais *commodities* produzida em várias regiões do país e em outras partes do mundo, que atualmente devido a suas grandes extensões cultivadas é afeitada por um inúmeros de fungos que causam estragos na planta, causando perdas economicamente para os agricultores. A geração de plantas de soja geneticamente modificadas com o gene *CYP51* surge como uma alternativa para a produção de soja no Brasil para diminuir doenças causadas pelos fungos, principalmente os de *Fusarium* spp e *Sclerotinia sclerotiorum*.

### 4. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi obter linhagens geneticamente modificadas de soja expressando o cassete de silenciamento contendo o gene *CYP51* para conferir resistência às doenças causadas por *Fusarium* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum*.

#### 4.1. Objetivos específicos

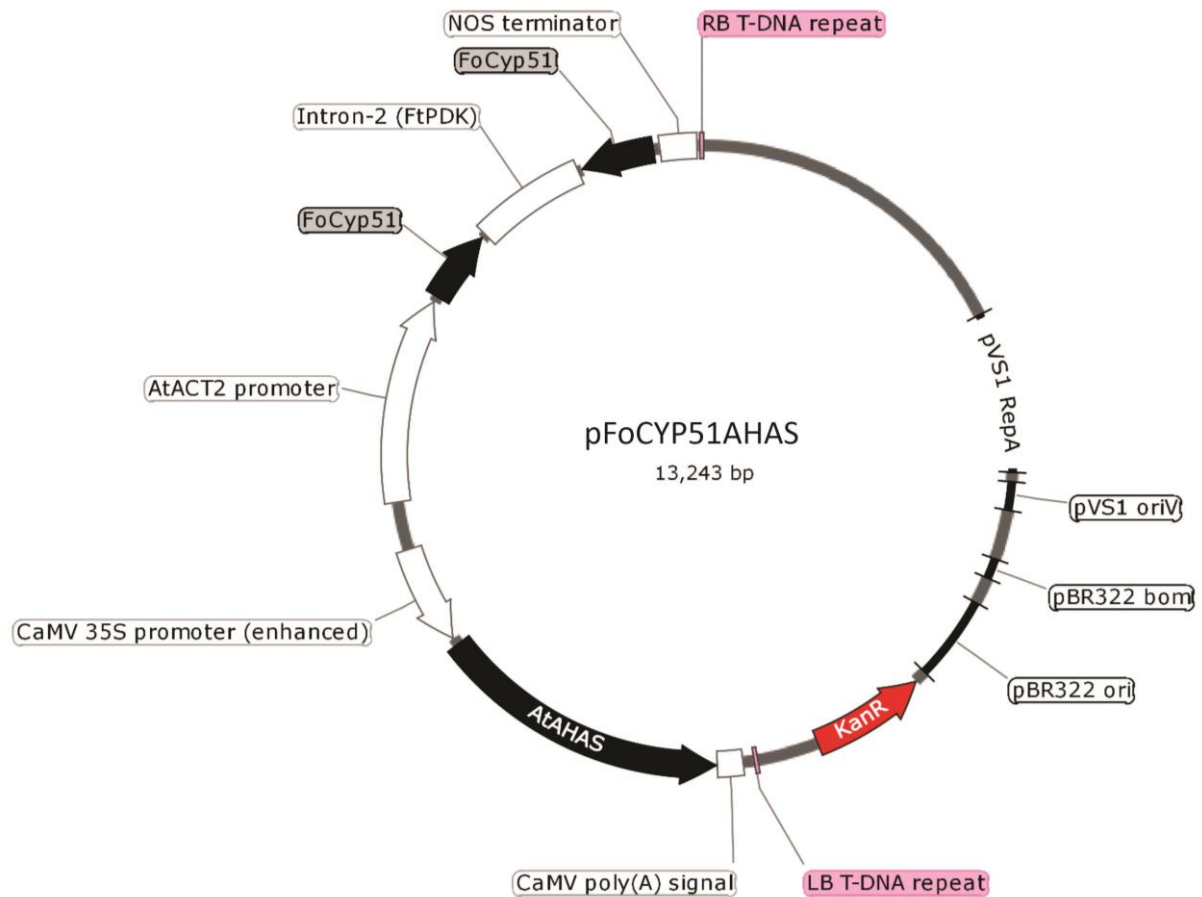
- Obter uma construção do tipo intron-hairpin para o silenciamento do gene *CYP51* em *Fusarium* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum*
- Produzir plantas de soja geneticamente modificadas via *Agrobacterium tumefaciens*;
- Analisar a segregação dos genes exógenos nas linhagens geneticamente modificadas;
- Testar as linhagens geneticamente modificadas para resistência aos fungos *Fusarium* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum*



## 5. Material e Métodos

### 5.1. Vetor de interferência de RNA

Para a construção do vetor de interferência, a sequência codificadora do gene *bar* do pCambia3300 foi substituída pela sequência codificadora de *ahas* mutantes de *Arabidopsis thaliana* (número de acesso do GenBank NM114714.3, posições 208 a 2220), entre o *XhoI*, gerando o pC3300Ahas. O cassete interferente do hpRNA ( $\Delta$ CYP51) contém o promotor do gene *actin 2* de *A. thaliana* (número de acesso GenBank LR699757.1, posições 6492838 a 6494239), o intron do gene *pyruvate orthophosphate dikinase (pdk)* de *Flaveria trinervia* (número de acesso GenBank X79095. 1, posições 7914 a 8658), e o terminador do gene *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase (*nos*) (número de adesão ao GenBank MK078637.1, posições 1 a 253). O fragmento do gene eburicol 14-alfa-demetilase (*CYP51B*) de *F. oxysporum* (número de acesso ao GenBank XM018376712.1, posições 754 a 1252) foi clonado na direção senso e anti-senso, flanqueando o intron do gene *pdk*. O cassete interferente foi sintetizado pela Epoch Life Science Inc., (EUA) e clonado entre PvuII e PmeI no vetor pC3300Ahas, gerando o vetor pFoCYP51AHAS (Figura 1 e 2a).



**Figura 2.** Vetor pFoCYP51AHAS contendo o gene *CYP51* controlado pelo promotor AtACT2 e o gene de seleção *ahas* controlado pelo promotor 35SCaMV.

### 5.2. Transformação de plantas de soja

Foram geradas plantas geneticamente modificadas de soja do cultivar Conquista e BRS7980 através de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* baseada no protocolo de Zeng *et al.*, 2004 com alterações.

As sementes foram desinfestadas em câmara vedada com o gás clorox, gás obtido da reação entre ácido clorídrico e hipoclorito de sódio da seguinte forma: 4 mL de ácido clorídrico 37% (v/v), 50 mL de hipoclorito de sódio 12% (v/v) e 50 mL de água destilada. As sementes ficaram na câmara por um período de 24h, em seguida foram colocadas em meio de germinação [saís de MS, vitamina B5 1X, sacarose 2% (p/v), ágar 0,8% (p/v) e pH ajustado para 5,8]. Para a transformação o explante utilizado foram os cotilédones com uma parte do hipocótilo de 5 mm. Após 7 dias, os cotilédones foram separados, as gemas já desenvolvidas foram removidas e o hipocótilo foi cortado, retirando a radícula. Os explantes passaram por uma cocultura

líquida [sais de B5 1X, sacarose 3% (p/v), 6-benzilaminopurina (BAP) 1,7 mg.L<sup>-1</sup>, acetoseringona 200 µM, vitamina B5 1X, ácido giberélico (GA3) 1,7 mg.L<sup>-1</sup> com pH ajustado para 5,2] por 40 minutos, seguido de uma cocultura sólida [sais de B5 1X, sacarose 3% (p/v), BAP 1,7 mg.L<sup>-1</sup>, acetoseringona 200 µM, vitamina B5 1X, GA3 1,7 mg.L<sup>-1</sup>, ditioneitol (DTT) 1 mM, L-cisteína 3 mM, tiosulfato de sódio 1 mM, ágar 0,8% (p/v) e pH ajustado para 5,2] por 5 dias a 20° C no escuro.

Após a cocultura, os explantes foram transferidos para um meio de indução de brotos [meio B5 completo 1X, sacarose 3% (p/v), BAP 1,7 mg.L<sup>-1</sup>, MES 3 mM, cefotaxima 100 mg.L<sup>-1</sup>, timentim 50 mg.L<sup>-1</sup>, fitagel 0,3% (p/v), imazapyr 600 ou 700 mM e pH ajustado para 5,7] por 30 dias. Os explantes que multibrotaram foram transferidos para o meio de alongamento [sais de MS 1X, MES 3 mM, sacarose 3%(p/v), vitaminas B5 1X, asparagina/glutamina 50 mg.L<sup>-1</sup>, ácido indolacético (AIA) 0,1 mg.L<sup>-1</sup>, GA3 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, zeatina-R 1 mg.L<sup>-1</sup>, cefotaxima 100 mg.L<sup>-1</sup> e timentim 50 mg.L<sup>-1</sup>, fitagel 0,3% (p/v), imazapyr 500 mM e pH ajustado para 5,7] até o surgimento de brotos com mais de 5 cm.

Os brotos com mais de 5 cm foram transferidos para meio de enraizamento [sais de MS 1X, MES 3 mM, sacarose 2% (p/v), vitaminas B5 1X, asparagina/glutamina 50 mg.L<sup>-1</sup>, ácido indolil-3-butírico (IBA) 1 mg.L<sup>-1</sup>, cefotaxima 100 mg.L<sup>-1</sup>, timentim 50 mg.L<sup>-1</sup>, ágar 0,8% (p/v) e pH ajustado para 5,7] onde permaneceram até o surgimento das raízes.

Todos os explantes foram repicados a cada 15 dias com exceção dos explantes em meio de enraizamento, onde os explantes permaneceram até o momento da aclimatização. Explantes com raízes de, pelo menos, 3 centímetros e 2 trifólios, foram aclimatizados em copos descartáveis de 300 mL com terra vegetal e vermiculita (1:1) e um saco transparente formando uma câmara úmida em casa de vegetação. Uma das laterais do saco foi cortada após 3 dias e então, após 7 dias, o saco foi completamente removido.

### 5.3. Avaliação de plantas transformadas por PCR

A extração de DNA foi realizada a partir de discos foliares, de acordo com Edwards *et al.*, (1991), a amostra foi macerada com bastão autoclavado, 400 µL de tampão CTAB 2X (1,4 M de cloreto de sódio, 100 mM de Tris-HCl pH 8.0, 20 mM de ácido etilenodiamino treta-acético-EDTA, 25mM de brometo de cetil-trimetilamônio

CTAB, 2% de polivinilpirrolidona-PVP) foram adicionados, e a suspensão mantida em agitador a 65°C por 20 minutos. Foram adicionados 400 µL de clorofil (clorofórmio 24: álcool isoamílico 1), a amostras foi homogeneizada e centrifugada a 14000 x g por 10 minutos. A fase aquosa contendo o DNA foi coletada em tubo limpo e precipitado por isopropanol. O sedimento foi lavado com etanol 70% (v/v), seco e ressuspendido em 20 µL de água Milli-Q autoclavada para proceder com as análises.

A análise molecular visando à detecção de  $\Delta CYP51$  foi feita utilizando-se para cada reação 2 µL de DNA ( $\approx 20$  ng) adicionados à solução contendo 17,45 µL de H<sub>2</sub>O; 2,5 µL de tampão 10X; 0,8 µL de dNTP (4 µM); 0,8 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 0,5 µL de cada primer (10 µM); e 0,5 µL de Taq polimerase (10 U/µL). Os iniciadores usados se apresentam na Tabela 1.

**Tabela 2.** Descrição dos iniciadores para amplificação do gene  $\Delta CYP51$ , e as sequências de nucleotídeos, o tamanho dos amplicons gerados em pares de bases (pb).

Gene	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)
CYP51 (FoCyp51)	F-CAT CGG GGT TGG GGA AGT AG	148
	R-CTT CAC GCC CCT ATC CAC TC	

As PCR foram realizadas em termociclador (MyCycler, Thermal Cycler, BioRad, USA), seguindo a temperatura inicial de desnaturação de 94°C por 5 min, e em seguida 35 ciclos de 94°C de desnaturação por 1 min, 55°C de anelamento/pareamento dos iniciadores por 1 min, síntese a 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% usando tampão TBE 0,5X e voltagem ajustada para 5 V/cm.

#### 5.4. Análise da progênie

Sementes da primeira geração de plantas transformadas (T<sub>1</sub>), provenientes da autofecundação das plantas T<sub>0</sub> foram germinadas no solo e mantidas em casa de vegetação. Essas foram analisadas para presença de *CYP51* por PCR conforme descrito acima para detectar a expressão do gene de interesse de acordo com Edwards *et al*, (1991). Análises de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), utilizando o fator de correção de Yates (Steel e Torrie, 1980), foram feitas para determinar se a segregação observada

seguia um padrão Mendeliano na razão de 3:1 ou 15:1, com 95% de nível de confiança.

### 5.5. *Análise de Northern blot para detecção de siRNAs*

O RNA total foi isolado das folhas e raízes por extração com Trizol (Thermo Fisher Scientific) como recomendado pelo fabricante. O RNA total (50 µg) foi separado por 20% PAGE com 7 M de uréia e 1X Tris-borate-EDTA (TBE). O gel foi corado com um 1X TBE contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml), e fotografado. Os RNAs foram eletroblotados a uma membrana de nylon com carga positiva BrightStar-Plus (Thermo Fisher Scientific), fixados por UV e hibridizados com uma sonda de DNA correspondente ao fragmento de PCR de 148 pb dentro do cassete  $\Delta CYP51$  (descrito acima). As sondas foram marcadas com  $\alpha^{32}\text{PdCTP}$  usando o Kit de marcação radioativa DecaLabel DNA (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. A hibridização e as lavagens pós-hibridização foram realizadas conforme descrito (Yoo *et al.* 2004). Três oligômeros (18, 24 e 44 nucleotídeos) foram usados como marcadores de tamanho molecular. A intensidade relativa das bandas foi determinada pela análise da intensidade da banda usando o Software de Análise Quantity One 1-D v4.6.3 (Bio-Rad). A quantificação relativa foi feita comparando as intensidades das faixas de siRNA nas seis linhagens transgênicas.

### 5.6. Bioensaios

#### 5.6.1. *Método de inoculação de sementes com esporos*

*Fusarium oxysporum* e *Fusarium graminearum* são fungos transgênicos que contém o gene *gus*, do Laboratório de Engenharia Genética da Embrapa Cenargen, identificados com os números Fo003-2018 e Fg013/2019, respectivamente, foram cultivados em meio BDA e incubados por 20 dias a temperatura ambiente. Após esse período, adicionaram-se 10 mL de água destilada e autoclavada nas placas com os fungos, e com auxílio de um pincel esterilizado homogeneizou-se a massa de esporos. Em seguida, filtrou-se essa suspensão para retirada de impurezas, e do filtrado foram utilizados  $5 \times 10^5$  esporos por  $\text{mL}^{-1}$  de *F. oxysporum* e de *F. graminearum*, quantificados em câmara de Neubauer para cada 2 g de sementes. As sementes ( $T_3$ ) das Linhagens Geneticamente Modificadas (LGM) de soja expressando o cassete de RNAi do gene

CYP51 permaneceram embebidas com a suspensão fúngica por 5 minutos de a mesma forma também o controle (plantas não transgênicas), quando foi drenado o excedente de água e mantidas em ambiente axênico (Souza *et al.*, 2008).

O delineamento experimental foi feito com três repetições, em um desenho completamente ao acaso, sendo cada parcela experimental representada por seis copos cada copo de 300 ml, contendo uma planta por copo. As variáveis avaliadas foram, germinação avaliada aos 10 dias após a semeadura na casa vegetação, altura de planta, massa seca da raiz e a severidade da doença aos 15 dias após a semeadura. A classificação do nível de dano nas plântulas foi de acordo com Hartman (1997), onde os índices de severidade foram definidos como: 1 = 0%; 2 = 10%; 3 = 35%; 4 = 65%; e 5 = 90%.

#### 5.6.2. Ensaio histoquímico das LGM com *Fusarium spp.*

As LGM inoculadas com *Fusarium spp.*, foram analisadas para detecção da expressão do gene *gus* em folhas, caules e raízes. Essas partes das plantas foram retiradas e colocadas em solução de X-gluc (X-Gluc 500 mg.L<sup>-1</sup>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05 M e Triton X-100 30%) e inoculadas a 37°C por 12 h. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas em etanol 70% para preservação e verificou-se a presença ou ausência de coloração azul indicativa da presença do fungo (Lacorte, 1998).

#### 5.6.3. Bioensaios de *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas destacadas

Os bioensaios foram realizados com folhas destacadas provenientes de plantas da geração T<sub>3</sub> com aproximadamente 45 dias de idade pré-selecionadas por PCR. Foram coletadas a terceira folha mais nova totalmente expandida de cada planta, sempre mantendo este padrão.

Para o inóculo foi usada uma cepa de *Sclerotinia sclerotiorum* do Laboratório de Engenharia Genética (LEG) da Embrapa Cenargen. Inicialmente, o fungo foi cultivado em meio BDA (batata-dextrose-água) a temperatura ambiente, até a formação do micélio. Da região de crescimento do micélio foram retirados os *plugs* de 5 mm de diâmetro, que consistem de pedaços de meio com fungo, para inocular na face adaxial das folhas. As folhas, com os *plugs* sobre elas, foram colocadas em câmara úmida sob temperatura de 25°C. As folhas foram fotografadas em dois

períodos (48 e 72h) após a inoculação, afim de acompanhar o desenvolvimento do fungo, quando em contato com as mesmas. As imagens foram usadas para tomar a medida da área infectada, usando o software ImagenJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

### 5.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por um delineamento completamente casualizado para três variáveis, taxa de germinação das sementes na presença do fungo, altura da planta e peso seco da raiz; nível de dano ocasionado pelo fungo *Fusarium* e área de lesão nas folhas causada pelo fungo *Sclerotinia* foi realizado em uma análise não paramétrica de Wilcoxon. As análises estatísticas foram realizadas com o programa SAS 9.0.

## 6. Resultados

### 6.1. Plantas de soja geneticamente modificadas

Neste trabalho, que foi realizado mediante a estratégia de silenciamento por RNAi do gene *CYP51*, usando o vetor pFoCYP51AHAS (Figura 2 e 5a), observou-se a presença do transgene em 26 linhagens T<sub>0</sub>, comprovadas mediante a técnica de PCR (Tabela 2), revelando assim a presença do cassete de interferência de  $\Delta CYP51$ .

A eficiência de transformação genética da soja cultivar BRS7980 via *Agrobacterium tumefaciens* foi de 5,17%. É importante mencionar que até a realização do ensaio 3 a pressão de seleção de imazapyr nos meios de cultura foi de 600 nM, e a partir do ensaio 4 o agente de seleção foi aumentado para 700 nM, para diminuir o número de plantas-escape que não apresentaram o gene de interesse (Tabela 2).

As plantas que mostraram a presença dos transgenes na análise por PCR foram aclimatadas e apresentaram-se fenotipicamente normais quando comparadas ao controle. Todas as plantas T<sub>0</sub> aclimatadas produziram sementes, gerando as próximas gerações (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>), também confirmadas por PCR (Figura 5b).

**Tabela 3.** Eficiência de transformação genética de plantas T<sub>0</sub> de soja BRS7980 via *A. tumefaciens* EHA 105, usando o protocolo de transformação de nós cotiledonares induzidos para organogênese

Vetor	Ensaio	Número total de Explantes	Plantas com o transgene (PCR+)	Plantas com o gene (%)
pFoCYP51AHAS	1	63	6	9,52
	2	87	6	6,90
	3	85	4	4,71
	4	110	4	3,64
	5	95	5	5,26
	6	106	1	1,00
<b>Total</b>		<b>546</b>	<b>26</b>	<b>31</b>
<b>Médias</b>		<b>91</b>	<b>4,33</b>	<b>5,17</b>

% de plantas com o gene = (Plantas com o gene / Explantes Cocultivados) \*100

A análise de segregação revelou que o transgene estava segregando em proporção Mendeliana em sete linhagens L1, L3, L4, L5, L7, L8, L10 e que apresentaram a taxa de segregação de 3:1, indicando estar presente em um *locus* apenas, dessas, seis linhagens L1, L3, L4, L5, L8 e L10 foram investigadas até a geração T<sub>3</sub>. A linhagem L2 apresentou a segregação de 15:1, indicando que dois *loci*



estão envolvidos no controle dessa característica. Entretanto as linhagens L6 e L9 não apresentaram segregação Mendeliana (Tabela 3).

**Tabela 4.** Análise da segregação de 10 linhagens da geração T<sub>1</sub>.

Linhagens	Positive	Negative	Teste de segregação	X <sup>2</sup>	P <sup>**</sup>
L1	5	2	3:1	0.11	0.83
L2	18	2	15:1	0.13	0.48
L3	10	4	3:1	0.09	0.76
L4	6	3	3:1	0.25	0.56
L5	8	2	3:1	0.40	0.72
L6	7	10	3:1	2.00	0.00
L7	5	1	3:1	0.66	0.64
L8	12	2	3:1	0.64	0.21
L9	4	9	3:1	0.12	0.00
L10	7	5	3:1	1.40	0.18

\*\* Dados baseados em análises de PCR para detecção de  $\Delta cyp51$ .

\*\*P, probabilidade que os valores observados reflitam a segregação esperada de 3:1 ou 15:1.

#### 6.2. Bioensaios de soja inoculadas com esporos de *Fusarium*

As seis linhagens com padrão de segregação Mendeliano que foram analisadas até a geração T<sub>3</sub> foram usadas para os bioensaios de inoculação de sementes com esporos de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium graminearum*, e após a análise de variância (ANOVA) foi confirmada a diferença significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre as quatro variáveis avaliadas - Germinação, altura da planta, nível de dano e massa seca - entre as linhagens, quando fungo *F. oxysporum* foi inoculado (Tabela 4). Posteriormente, procedeu-se o teste de médias de Duncan com 5% de probabilidade, para separar os grupos e ter uma perspectiva mais ampla da melhor ou das melhores linhagens resistentes aos fungos avaliados.

**Tabela 5.** Quadrados médios da análise de variância geral de seis linhagens geneticamente modificadas (LGM) de soja e o controle (NGM), inoculadas com *F. oxysporum*.

F.V.	gl	Germinação	A/planta	Nível de dano	Massa seca da raiz
Lin.	6	119.048 *	6.404 **	435.363 **	0.011 **
Error	14	38.905	0.888	108.329	0.003
C.V.		6.389	12.298	28.14	16.039
R <sup>2</sup>		0.629	0.785	0.79	0.692

\* =significativo 0.05 e \*\*= significativo 0.01; F.V=Fonte de Variação; Lin= Linhagens; Rep= Repetição; C.V= Coeficiente de Variação; R= R quadrada; gl=Graus de liberdade; A/planta=Altura da planta.

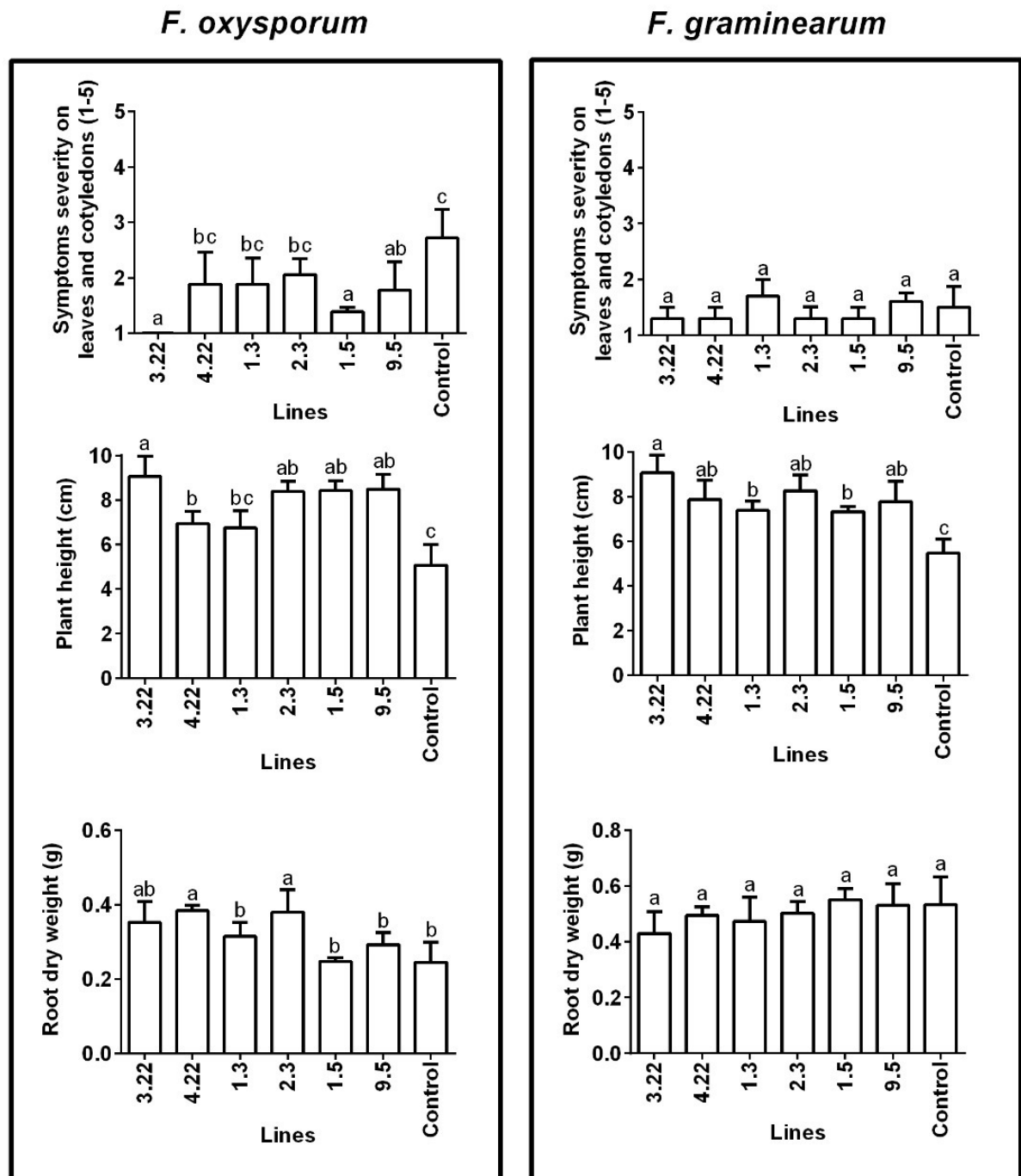
De acordo com o teste de Duncan  $P \leq 0.05$  pode-se verificar que as linhagens GM que contêm o gene *CYP51* e que foram inoculadas com *F. oxysporum* tiveram uma germinação de 100%, enquanto que no controle NGM apenas 83% das sementes germinaram. Da mesma forma, pode-se observar que em relação à altura das plantas, as linhagens GM foram superiores ao controle NGM (Figura 3). Para o nível de dano foi avaliada em porcentagem, a linhagem 3.22 não apresentou sintomas nos cotilédones, hipocótilos e folhas, enquanto no controle os sintomas observados foram clareamento das nervuras, com mudança da tonalidade verde para amarelo, seguidos de murcha, sementes totalmente infestadas com o fungo e senescência das folhas e se observou em menor incidência nas outras linhagens (Figura 4). Por último, na massa seca das raízes se encontrou diferença só para as linhagens 4.22 e 2.3, que apresentam significativamente estatisticamente maior massa seca quando comparadas ao controle NGM (Figura 3).

No experimento de desafio das linhagens da soja com *F. graminearum* o ANOVA revelou diferença significativa ( $P \leq 0.05$ ) na altura da planta, enquanto que nas demais variáveis avaliadas não se observou nenhuma diferença estatística (Tabela 5). Posteriormente, no teste de Duncan ( $P \leq 0.05$ ) para essa variável foi observado que as linhagens GM foram superiores ao controle, sobressaindo-se a linhagem 3.22 com uma altura de aproximadamente 9 cm comparada ao controle que apresentou 6 cm de altura (Figura 3).

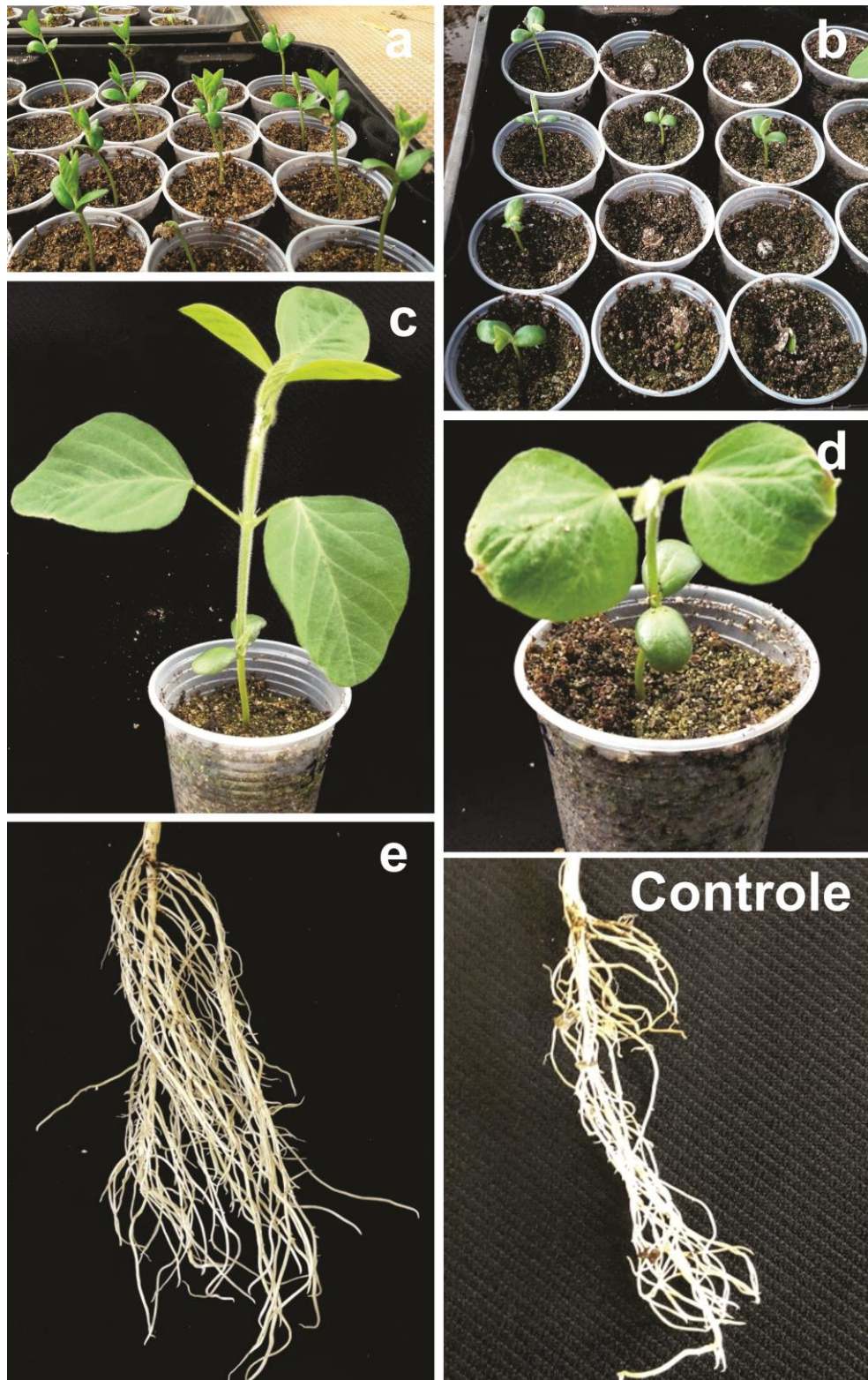
**Tabela 6.** Quadrados médios da análise de variância geral de seis linhagens geneticamente modificadas (LGM) de soja e o controle (NGM), inoculadas com *F. graminearum*

<b>F.V.</b>	<b>gl</b>	<b>Germinação</b>	<b>A/planta</b>	<b>Nível de Dano</b>	<b>Massa Seca da raiz</b>
Lin.	6	13.762	3.697 **	31.648	0.005
Error	14	12.512	0.713	62.929	0.007
C.V.		3.74	11.114	51.265	17.135
R <sup>2</sup>		0.4	0.74	0.231	0.335

\*\*= significativo 0.01; F.V=Fonte de Variação; Lin= Linhagens; Rep= Repetição; C.V= Coeficiente de Variação; R= R quadrada; gl=Graus de liberdade; A/planta=Altura da planta.



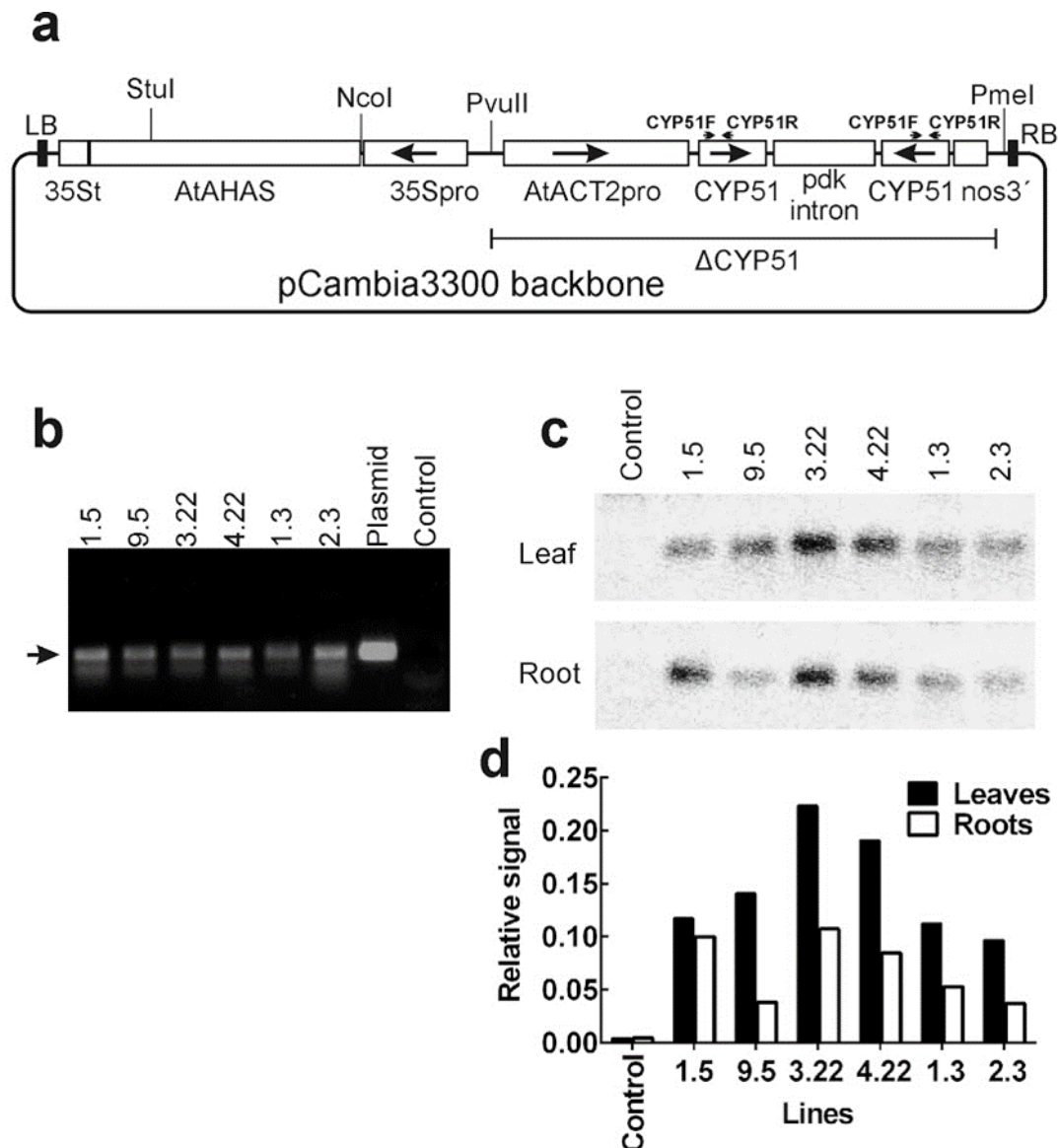
**Figura 3.** Avaliação de variáveis agrônômicas em seis linhagens GM de soja que contém o gene *CYP51* e um controle NGM, inoculados com o fungo *F. oxysporum* e *F. graminearum*, respectivamente. Linhagens com a mesma letra não apresentam diferenças significativas, Duncan 5%.



**Figura 4.** Resposta da resistência das plantas transgênicas de soja inoculadas com *F. oxysporum*: Aos 10 e 15 dias após inoculação (a) transgênicos (b) não transgênicos; (c) ausência de sintomas nas plantas transgênicas da linhagem 3.22 aos 15 dias após

inoculação; (d) planta não transgênica com sintomas nas folhas (e) raiz de planta transgênica 3.22 (f) raiz da planta não transgênica.

Análises de *Northern Blot* foram realizadas para detectar os siRNAs em folhas e raízes de plantas transgênicas e não transgênicas (Controle). A análise demonstrou a presença de bandas de siRNAs do tamanho esperado nas linhagens GM 1.5, 9.5 3.22, 4.22, 1.3, 2.3. Nenhum sinal detectável foi observado na linhagem controle NGM (Figura 5c), e a maior presença de siRNA foi quantificado na linhagem 3.22 principalmente nas folhas (Figura 5d). Estes resultados mostram uma correlação positiva entre a presença de siRNA detectável e a redução da severidade da doença de *F. oxysporum* nas plântulas da LGM de soja avaliadas aos 15 dias após a semeadura, principalmente da linhagem 3.22; também para o fungo de *S. sclerotiorum* que foi inoculado nas folhas destacadas das plantas, onde uma área menor de lesão foi observada nas plantas transgênicas, em comparação com o controle (planta não GM) nos dois períodos de avaliação de 48 e 72 horas (Figura 7a).

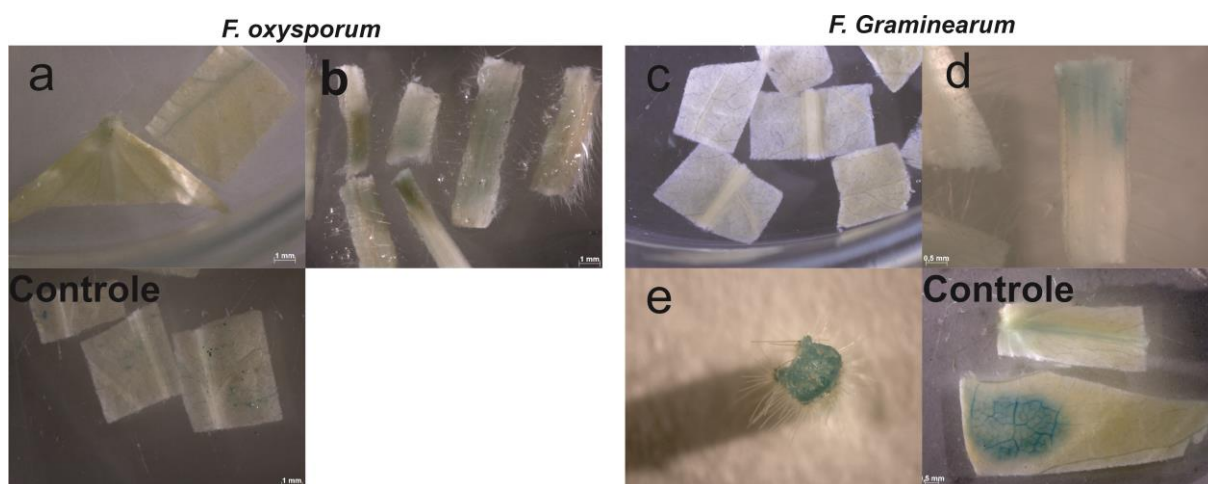


**Figura 5.** Engenharia Genética de soja para expressar dsRNA para silenciar o gene de *Fusarium CYP51*. (a) Diagrama representando do vetor (pFoCYP51AHAS) utilizado para transformar plantas de soja. Que contém um fragmento do gene *CYP51* de 502 pb de *F. oxysporum* que foi clonado na direção senso e anti-senso, flanqueando o intron do gene de *Flaveria trinervia pdk*, sob o controle do promotor de actin 2 de *A. thaliana* (*AtACT2pro*) para a construção do cassete intron-hairpin RNAi ( $\Delta CYP51$ ). O vetor pFoCYP51AHAS também contém o gene *A. thaliana ahass* mutante (*AtAHAS*), sob o controle do promotor 35SCaMV (35Spro), que confere tolerância às imidazolinonas, usado como seleção. *nos3'*: terminador do gene *nopaline synthase* de *A. tumefaciens*; 35St: Terminador do RNA do vírus do mosaico da couve-flor; LB: sequência da borda esquerda; RB: borda direita. (b) Análise de PCR realizada com os



primers CYP51F e CYP51R confirmou a presença do cassete  $\Delta CYP51$  (seta) em seis linhagens transgênicas. (c) Análise de *Northern blot* usando a sonda *CYP51* (fragmento amplificado por PCR) para detecção do siRNA correspondente  $\Delta CYP51$ . (d) Quantificação relativa do siRNA nas seis linhas transgênicas. O Controle é uma planta não-transgênica (NGM).

O ensaio histoquímico revelou a presença dos fungos nas folhas das plantas controle (LNGM) para os dois fungos avaliados, já que apresentaram a coloração azul (Figura 6), enquanto que nas plantas transgênicas somente o fungo foi observado no pecíolo das folhas (Figuras 6b, 6d e 6e) para ambos os fungos, e não foi observada a presença dos fungos nas folhas das plantas transgênicas (Figura 6a e 6c).



**Figura 6.** Ensaio histoquímico das plantas que foram inoculadas com os fungos *Fusarium* spp.: a, b folhas e pecíolos de plantas transgênicas inoculadas com *F. oxysporum* e controle (folha de planta não transgênica); c, d, e, folhas e pecíolos de plantas transgênicas inoculadas com o fungo *F. graminearum* e controle (planta não transgênica).

### 6.3. Bioensaio em folhas destacadas

O bioensaio feito com as LGM da geração T<sub>3</sub> inoculadas nas folhas destacadas com *Sclerotinia sclerotiorum* a fim de demonstrar o efeito do silenciamento gerado pela planta no fungo, mostrou que algumas das linhagens apresentaram uma maior tolerância à colonização pelo fungo.

De acordo com as análises de variância geral (ANOVA) foram observadas diferenças significativas entre as linhagens geneticamente modificadas (LGM) e a



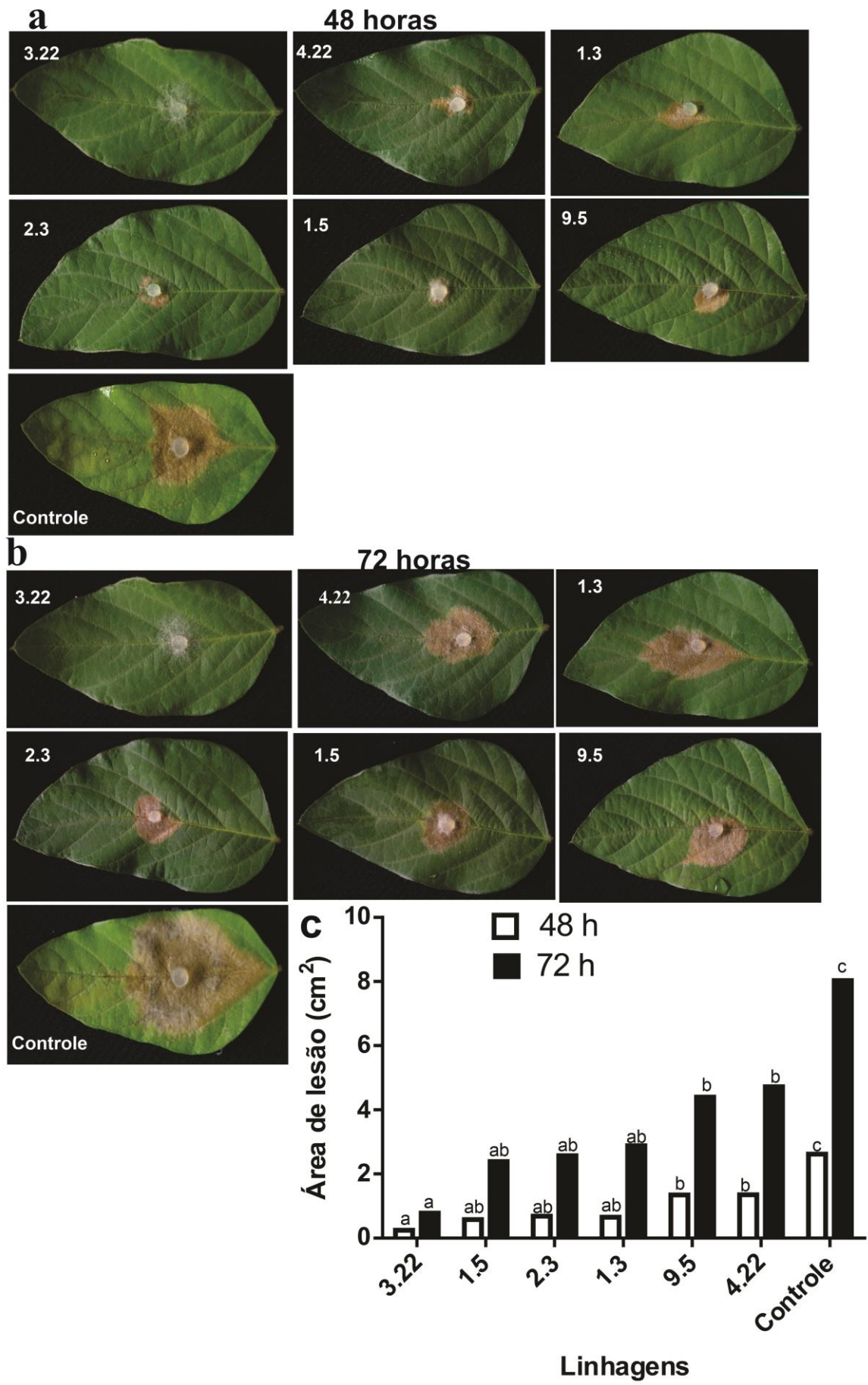
linhagem não transgênica ou controle ( $P \leq 0.01$ ) após a inoculação das folhas, nos períodos avaliados de 48 e 72 horas (Tabela 6). De acordo com a prova de médias Duncan, a 5% de probabilidade, observou-se o menor diâmetro das lesões em todas as linhagens GM, em comparação com o controle nos dois períodos de avaliação (Figuras 7a e 7b). A área infectada às 72 h após a inoculação do fungo variou em média de 0,8 cm<sup>2</sup> a 4,8 cm<sup>2</sup> nas linhagens transgênicas, enquanto que no controle (plantas não transgênicas) a área infectada foi em média de 8,08 cm<sup>2</sup> (Figura 4c).

**Tabela 7.** Quadrados médios da análise de variância geral de seis linhagens transgênicas (LGM) e um controle (LNGM) inoculadas com o fungo *Sclerotinia Sclerotiorum* pelo método de folha destacada

F.V	gl	48 h	72h
Linhagens	6	1161.925 **	1199.020 **
Error	56	0.946	8.046
C.V		22.768	33.059
		0.483	0.492

\*\*= significativo 0.01; F.V=Fonte de Variação; C.V= Coeficiente de Variação; R<sup>2</sup>= R quadrada; gl=Graus de liberdade; 48 h= avaliação após 48 horas após inoculação; 72= avaliação após 72 horas após inoculação.

A linhagem GM que apresentou o menor dano foi a 3.22, sendo 7 vezes menor quando comparado com o dano do controle; seguida das linhagens 1.5, 2.3 e 1.3, que apresentaram dano pelo menos três vezes menor em comparação com o controle não GM (Figura 7c).



**Figura 7.** Inoculação de folhas destacadas de linhagens GM de soja e um controle (LNGM) com o fungo de *Sclerotinia sclerotiorum*: a e b) Detalhe das linhagens GM à resposta ao crescimento do micélio após 48 h e 72 h comparada à planta controle, demonstrando que a área lesionada foi menor nas linhagens transgênicas em comparação com o controle as 72 h; c) Avaliação da área de lesão em dois tempos 48 e 72 h de seis linhagens GM de soja e um controle; linhagens com a mesma letra não apresentam diferenças significativas, Duncan 5%.

A similaridade do fragmento do gene de *CYP51* usado do fungo de *F. oxysporum* apresenta uma identidade de 70% com o gene *CYP51* do fungo de *S. sclerotiorum*. Devido a essa identidade, quando as folhas de soja GM foram inoculadas com o fungo *S. sclerotiorum*, elas também apresentaram resistência ao fungo (Figura 7a e 7b).

#### 6.4. Correlações

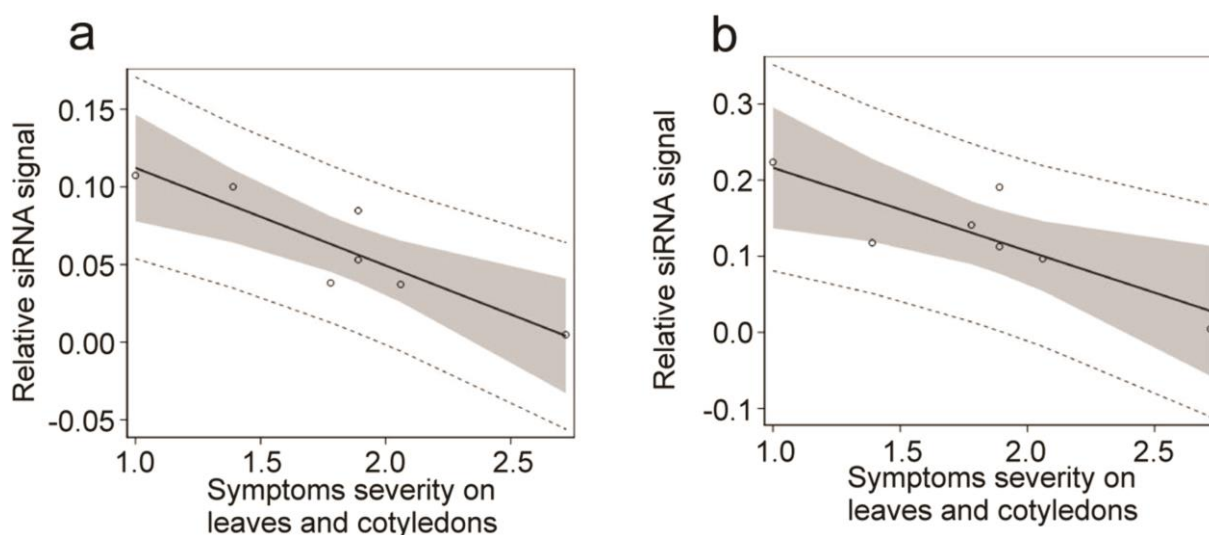
De acordo com a correlação das variáveis avaliadas foi observado que a germinação das plantas está correlacionada positivamente, já que foi estatisticamente significativa  $P \leq 0.01$ , isto indica que sim, o potencial de germinação das sementes é prejudicado pelo fungo, por conseguinte afeta a altura da planta. Nessas análises também foram observadas correlações negativas significativas entre germinação e o nível de dano, altura da planta e a doença, essas variáveis indicam que se a germinação das sementes é uniforme, a doença diminui, e o mesmo acontece com a altura das plantas, também observou-se correlação positiva entre germinação e massa seca ao nível de 5% (Tabela 7) e de acordo com esse resultado indica que a germinação influencia no conteúdo de massa seca das raízes da planta.

A correlação do siRNA contido nas folhas e raízes, em relação aos níveis de danos nas plantas, foi observado que quanto maior o teor de siRNA, menor o nível de danos causados pelo fungo (Figuras 8a e 8b), sendo uma relação inversa.

**Tabela 8.** Correlação Pearson de quatro variáveis agronômicas avaliadas em linhagens geneticamente modificadas (LGM) de soja inoculadas com o fungo *Fusarium oxysporum*.

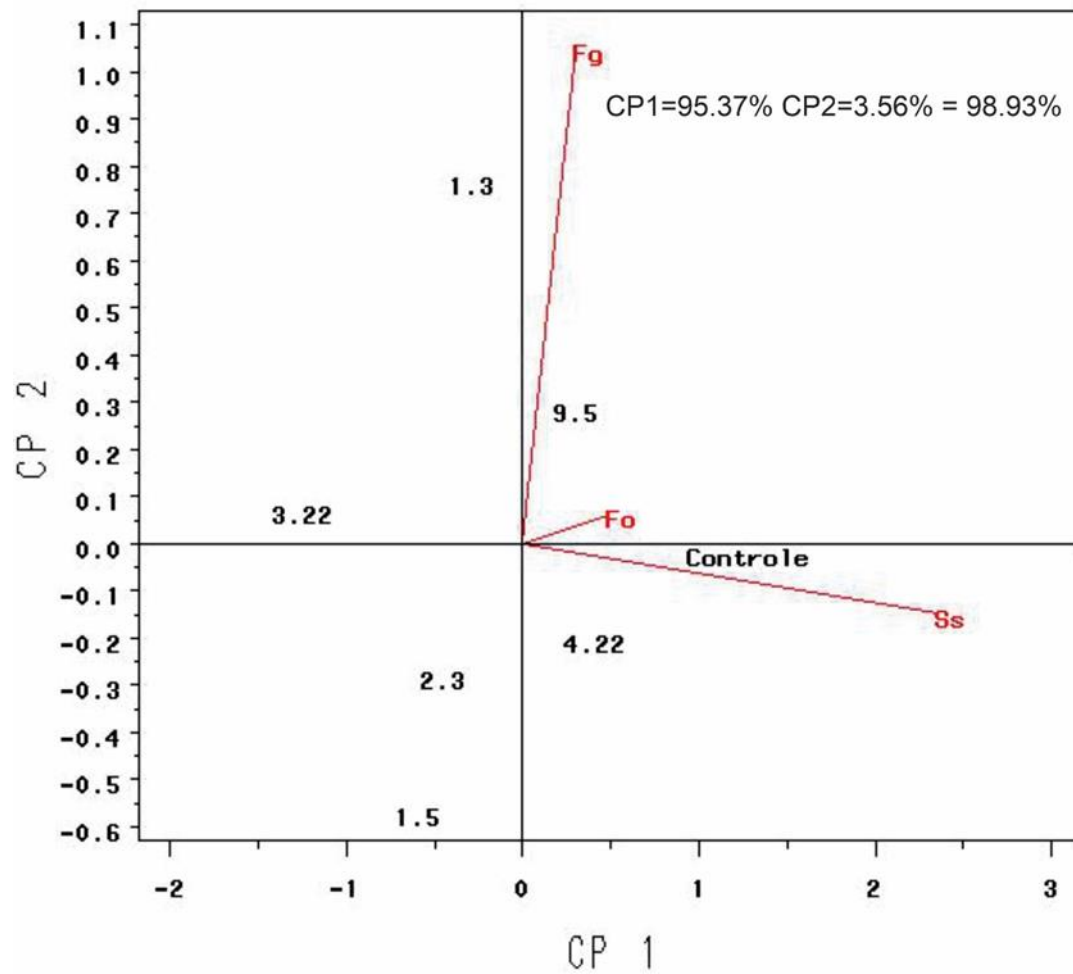
	Germinação	Altura/planta	Nível de dano	P/seco
<b>Germinação</b>	1	0.66542 **	-0.55831 **	0.47291 *
<b>Altura/planta</b>		1	-0.65532 **	0.18187
<b>Nível de dano</b>			1	-0.23037
<b>P/seco</b>				1

\*= significativo 0.05 e \*\* significativo 0.01; P/seco= Peso seco



**Figura 8.** Correlação entre as quantidades de siRNA nas raízes (a) e folhas (b) e a severidade dos sintomas induzidos pelo *Fusarium oxysporum* nas seis linhagens modificadas (LGM) de soja. Correlações de Pearson  $r = -0,89$  ( $p < 0,006$ ) e  $r = -0,83$  ( $p < 0,019$ ), respectivamente. Área cinza = 95% limites de confiança; linhas traçadas = 95% limites de previsão.

Na figura 9, representa a dispersão da interação das seis linhagens transgênicas e o controle com os fungos de *F. oxysporum*, *F. graminearum* e *S. sclerotiorum* que foram inoculados, com uma valoração de 98,93% da variação total do nível de dano. Assim, as linhagens transgênicas 3.22, 2.3, e 1.5 foram as que não tiveram interação com os três fungos supramencionados, e o controle (NGM) interagiu com os fungos *F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*, e as linhagens transgênicas 1.3 e 9.5, tiveram mais afinidade com o fungo do *F. graminearum* apesar que não foi significativo, e a linha 4.22 interagiu com o fungo *S. sclerotiorum*.



**Figura 9.** Interação das linhagens com os três fungos, em relação ao nível de danos provocados pelos fungos. Fg= *F. graminearum*, Fo= *F. oxysporum*, Ss= *S. sclerotiorum*.

## 7. Discussão

Desde a elucidação do mecanismo de RNAi, há aproximadamente duas décadas, as evidências se acumularam para indicar um papel do RNA na defesa das plantas. A imunidade mediada por RNA foi inicialmente melhor compreendida na defesa antiviral (Baulcombe, 2004; Ding, 2010). As plantas infectadas por vírus adquirem imunidade produzindo siRNAs derivados de sequências gênicas dos próprios vírus, dependentes de Dicer Like que guiam as proteínas AGO a RNAs virais, e assim ajudam a deter a infecção (Guo *et al.*, 2019). Entretanto, só recentemente foi estabelecido um papel para os siRNAs na defesa das plantas durante infecções por patógenos celulares, especialmente patógenos eucarióticos, incluindo fungos e Omicetos.

O gênero *Fusarium* causa várias doenças na soja, provocando graves perdas de produtividade. As espécies patogênicas de *Fusarium* podem causar murchamento da planta, síndrome de morte súbita, assim como doenças na semente, e morte das plântulas e apodrecimento das raízes, resultando em plantações mal estabelecidas, emergência tardia e plantas com crescimento atrofiado (Brar *et al.*, 2011, Pudake *et al.*, 2013, Hartman *et al.*, 2015b, Zhang *et al.*, 2019). O manejo das doenças causadas por *Fusarium* envolve o uso de sementes de alta qualidade, tratadas com fungicidas, tempo correto de plantio e melhores condições de solo, com práticas de drenagem e de plantio direto. Entretanto, essas intervenções são limitadas, caras e associadas a problemas ambientais. Consequentemente, a resistência do hospedeiro proporciona uma abordagem mais conveniente e econômica (Ellis *et al.*, 2011; Wegulo *et al.*, 2015; Hollomon, 2017; Machado *et al.*, 2018).

Os avanços nas tecnologias de engenharia genética e a compreensão da natureza nos mecanismos de proteção das plantas proporcionaram um meio para o desenvolvimento de novas estratégias para o controle de doenças das plantas, em associação com abordagens básicas de manejo. Como uma prova de conceito relatamos que a expressão do dsRNA (estratégia RNAi), correspondente a um gene fúngico vital, em plantas geneticamente modificadas poderia prejudicar a expressão do gene fúngico no patógeno que interage com os tecidos vegetais (Tinoco *et al.*, 2010). Desde então, evidências crescentes indicam que a tecnologia RNAi pode ser usada para a obtenção de genótipos resistentes a fungos (Nunes e Dean, 2012;

Panwar *et al.*, 2016; Wang e Dean, 2020). Esta tecnologia demonstrou ser eficaz em vários patógenos fúngicos, incluindo *Puccinia striiformis f. sp.* (Yin *et al.*, 2018, Zhang *et al.*, 2012), *Blumeria graminis* (Nowara *et al.*, 2010, Pliego *et al.*, 2013), *P. tritici* (Panwar *et al.*, 2013), *F. oxysporum f. sp. cubense* (Ghag *et al.*, 2014), *Sclerotinia sclerotiorum* (Andrade *et al.*, 2015), *Bremia lactucae* (Govindarajulu *et al.*, 2015), *Botrytis cinerea* (Wang *et al.*, 2016) e *F. culmorum* (Chen *et al.*, 2016).

Demonstrou-se que a introdução de um cassete intron-hairpin para silenciar o gene *Fusarium CYP51* ( $\Delta CYP51$ ) em soja gerou linhagens resistentes tanto a *F. oxysporum* quanto a *F. graminearum*. De seis linhas transgênicas de soja testadas para resistência ao *F. oxysporum*, três linhas (3.22, 1.5, e 4.22) apresentaram sintomas leves ou nenhum sintoma nas folhas e raízes. A linhagem transgênica 3.22 foi classificada como 1 na escala de severidade da doença. A análise de *Northern blot* revelou que essas linhagens apresentavam maiores quantidades de siRNA nas folhas e raízes. Foi observada uma correlação negativa entre as quantidades de siRNA tanto nas folhas e nas raízes versus a severidade dos sintomas, que parece ser significativa, levando em consideração a variação do complexo natural na expressão dos transgênicos o que indica que pode sugerir uma associação entre a expressão  $\Delta CYP51$  e a resistência. Foi demonstrado que as construções gênicas que codificam um RNA de dupla fita, decorrente da expressão de um gene quimérico correspondente a uma estrutura na forma de grampo podem induzir eficazmente o silenciamento gênico (90 a 100%) (Smith *et al.*, 2000, Wesley *et al.*, 2001, Nunes *et al.*, 2006, Bonfim *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2015; Shapulatov *et al.*, 2018). Foi encontrada uma correlação positiva entre a presença de siRNA detectável e a redução da agressividade da doença nas folhas de tabaco, transformadas para resistência ao *S. sclerotiorum* (Andrade *et al.*, 2015). Além disso, um estudo envolvendo folhas de plantas de *Festuca arundinacea* relatou que o siRNA foi observado em plantas resistentes à mancha marrom que é causada pela *Rhizoctonia solani* (Zhuo *et al.*, 2016). Outro estudo confirmou que a expressão de siRNA derivado do gene *Pst*, envolvido com a patogenicidade do fungo *Puccinia striiformis f. sp. tritici* foi eficaz no controle da doença da ferrugem no trigo (Zhu *et al.*, 2017). A resistência a outras espécies de *Fusarium* foi obtida por estratégias HIGS para silenciar o gene *CYP51*. A resistência ao *F. graminearum* foi obtida em cevada geneticamente modificada e *A. thaliana* (Koch *et al.*, 2013, Cheng *et al.*, 2015).

A análise do siRNA revelou uma variação dos níveis de expressão em distintas linhagens transgênicas com uma correlação entre expressão nas raízes e folhas, exceto para a linha 1.5, que foi expressa mais nas raízes do que nas folhas e linhagem 9.5, que foi expressa mais fortemente nas folhas do que nas raízes. A integração de um gene estranho no genoma é um processo aleatório, e estudos têm mostrado evidências de que a estrutura da cromatina que envolve os *loci* de integração transgênica tem um forte efeito em seu nível de expressão (para uma revisão ver Kohli *et al.*, 2006).

Quando linhagens geneticamente modificadas foram desafiadas contra *F. graminearum* não foram observadas diferenças na gravidade da doença, com base nos sintomas observados nas partes aéreas das plantas, nem no desenvolvimento radicular, provavelmente devido à interação hospedeiro-patógeno (soja cv BRS7980 vs. fungo isolado). Entretanto, foi observada uma influência notável da expressão de  $\Delta CYP51$  na altura da planta. Foi demonstrado que a maioria dos isolados de *F. graminearum* são patogênicos para a soja; entretanto, apenas alguns causaram uma diminuição significativa no desenvolvimento de germinação (Xue *et al.*, 2007, Barros *et al.*, 2014). O mecanismo de tolerância natural da soja a *Fusarium* é desconhecido, mas pode estar relacionado à sensibilidade às micotoxinas, que parece ser diferente dependendo do tecido, explicando como o fungo afeta preferencialmente um órgão específico da planta. Foi relatado que *loci* separados poderiam controlar a resistência da soja em folhas e raízes (Kazi *et al.*, 2008). Raízes do cv BRS7980 poderiam apresentar alguma tolerância ao *F. graminearum*, que ainda poderia infectar tecidos e produzir toxinas que se translocam para afetar o desenvolvimento do caule e a altura da planta.

Embora os resultados aqui apresentados sejam provenientes de avaliações em casa vegetação, há evidências que indicam uma relação na gravidade dos sintomas foliares entre os resultados de campo e de casa vegetação (Stephens *et al.*, 1993; Wrather, 2001; Hashmi *et al.*, 2005; Navi e Yang, 2008).

Outro fungo que afeta centenas de espécies vegetais é *Sclerotinia sclerotiorum*, um patógeno pertencente à família *Sclerotiniaceae*, Ascomycete (Kabbage *et al.*, 2015; Navaud *et al.*, 2018). *S. sclerotiorum* está amplamente disperso pelo mundo e representa uma ameaça significativa à produção agrícola (Derbyshire e Denton-Giles, 2016). A sequência de *CYP51* de *F. oxysporum* escolhida para esse



trabalho apresenta 70% de identidade com *CYP51* de *S. sclerotiorum*. Por conseguinte, as linhagens de soja GM foram também desafiadas contra *S. sclerotiorum*, obtendo-se menor área de lesões de infecção em seis linhagens GM quando estas foram comparadas com o controle. As linhagens GM tiveram uma redução na área de infecção de 41 a 90% após 72 h, onde se pode ver a expressão significativa do  $\Delta CYP51$ , principalmente na linha 3.22 que teve a menor área de lesão de 0,781 cm<sup>2</sup>. Andrade *et al.* (2015) também utilizaram o RNAi para reduzir a virulência do *S. sclerotiorum* em plantas de tabaco, com a seleção do gene estrutural, *chitin synthase* (Chs), onde observaram em cinco linhagens geneticamente modificadas a redução na severidade da doença 72 horas após a inoculação com o fungo, variando de 55% a 87% quando comparadas às linhagens não transgênicas.

Outro trabalho reportado em plantas transgênicas de *A. thaliana* e cevada (*Hordeum vulgare* L.) com expressão de hpRNAs para os genes *CYP51* de *Fusarium* que não mostraram crescimento fúngico no local da inoculação (Koch *et al.*, 2013). Em banana (*Musa* sp.), o silenciamento mediado por RNAi do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense velvet* e genes de fator de transcrição 1, mostrou falta de infecções externas e internas nas linhas transgênicas em um bioensaio de casa vegetação (pós-inoculação) com duração de seis semanas. Foi observada uma resistência significativa (redução de 70-85% nos sintomas da doença) contra o *F. oxysporum* nas plantas GM aos 8 meses pós-inoculação (Ghag *et al.*, 2014). Em *A. thaliana* silenciaram três genes *FOW2*, *FRP1* e *OPR*, posteriormente foram inoculadas com o fungo de *F. oxysporum*, as taxas de sobrevivência após a infecção fúngica foram maiores nas linhagens transgênicas *FOW2* 25%, *FRP1* 30-50% e *OPR* 45-70%, em comparação com as plantas controle, que teve uma sobrevivência de 10% (Hu *et al.*, 2015).

Em outro estudo conduzido por Chen *et al.* (2016), em plantas de trigo transgênicas estáveis com uma construção do tipo intro-hairpin para silenciar o gene *fcGls1* de *F. culmorum*, mostraram maior resistência de (~50-75% de redução nos sintomas da doença) os ensaios de inoculação de folha e espiga foram feitos em casa de vegetação e em condições próximas ao campo, respectivamente. Zhang *et al.* 2016, relataram que RNAi foi efetivo contra o gene *Verticillium dahliae* usando-se como gene alvo *hygrophobin1* (*VdH1*) para reduzir os sintomas da doença em 50-75% em algodão transgênico (*Gossypium* sp.). Também observaram maior resistência a

doenças nas linhas de algodão transgênico positivamente correlacionadas com a presença de siRNAs específicos de *VdH1* e expressão reduzida do gene alvo, como evidenciado pela análise de RNA gel blot.

## 8. Conclusão

Neste trabalho, foi demonstrada a importância do uso de ferramentas moleculares para gerar plantas geneticamente modificadas, principalmente o papel desempenhado pelo RNAi para silenciar os genes fúngicos que causam danos a culturas importantes como a soja.

*Fusarium spp.* causam graves problemas de doenças em várias culturas em todo o mundo, tais como tomate, feijão, batata, trigo e banana. No presente trabalho, foi demonstrado que HIGS pode ser uma estratégia eficaz para engenharia de resistência a *F. oxysporum* e *F. graminearum* em soja e poderia ser estendida para alcançar resistência a *Fusarium spp* em outras espécies vegetais.

Neste trabalho também foi demonstrado que um gene endógeno do fungo necrotrófico bastante agressivo, *S. sclerotiorum*, pode ser parcialmente controlado com o silenciamento de seu ortólogo a *CYP51* de *Fusarium*.

## 9. Considerações finais e perspectivas

Em um trabalho futuro seria interessante avaliar as linhagens, em maior escala a campo, principalmente a linhagens 3.22 já que demonstrou ser a mais resistente aos fungos de *F. oxysporum* e *S. sclerotinia*. Questões relevantes como efeito sobre organismos não-alvo (off-target) devem ser considerados, uma vez que várias espécies fúngicas, incluindo endofíticos, são de grande relevância para o ciclo de vida das plantas (desenvolvimento, tolerância a estresses etc.).

Avaliar a linhagens 3.22 contra outros fungos mais agressivos tais como *F. tucumaniae*, *F. brasiliense*, *F. virguliforme*, *F. cuneirostrum*, *F. crassistipitatum*, entre outros.

## 10. Bibliografia

- Alakonya, A., Kumar, R., Koenig, D., Kimura, S., Townsley, B., Runo, S., Garces, H.M., Kang, J., Yanez, A., David-Schwartz, R., Machuka, J. and Sinha, N. 2012. Interspecific RNA interference of shoot meristemless-Like disrupts *Cuscuta pentagona* plant parasitism. *Plant Cell*, 24, 3153–3166.
- Andrade, C. M., Tinoco, M. L. P., Rieth, A. F., Maia, F. C. O and Aragão, F. J. L. 2015. Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*.
- Almeida, A.M.R., Ferreira, L.P., Yorinori, J.F.V., Godoy, C.V., Costamilan, L.M., Meyer, M.C. 2005. Manual de fitopatologia. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 581p.
- Aly, R., Cholakh, H., Joel, D.M., Leibman, D., Steinitz, B., Zelcer, A., Naglis, A., Yarden, O. and Gal-On, A. 2009. Gene silencing of mannose 6-phosphate reductase in the parasitic weed *Orobancha aegyptiaca* through the production of homologous dsRNA sequences in the host plant. *Plant Biotechnol. J.* 7, 487–498.
- Aoki, T., O'Donnell, K., Homma, Y., Lattanzi, A. R. 2003. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex-*F. solani* f. sp. *glycines* in North America and *F. tucumaniae* in South America. *Mycologia* 95: 660–684.
- Aoki, T., Scandiani, M.M., O'Donnell, K. 2012. Pheotypic, molecular phylogenetic, and pathogenetic characterization of *Fusarium crassispitatum* sp. nov., a novel soybean sudden death syndrome pathogen from Argentina and Brazil. *Mycoscience* 53: 167–186.
- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431:356-63.
- Baum, J.A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann. P., Ilagan, O. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotechnol.*11:1322-6.
- Barros, G.G., Zanon, M.S.A., Chiotta, M.L., Reynoso, M.M., Scandiani, M.M., and Chulze, S.N. 2014. Pathogenicity of phylogenetic species in the *Fusarium graminearum* complex on soybean seedlings in Argentina. *European Jornal of Plant Pathology* 138, 215–222.
- Bell, A. A and Wheeler, M.H. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.24, p. 411-45.
- Brar H.K., Swaminathan, S., Bhattacharyya, M.K. 2011. The *Fusarium virguliforme* Toxin *FvTox1* Causes Foliar Sudden Death Syndrome-Like Symptoms in Soybean *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 1179-1188.

- Brent, K.J. 1995. Fungicide Resistance in Crop Pathogens, How Can it Be Managed. Brussels: Global Crop Protection Federation.
- Broders, K.D., Lipps, P.E., Paul, P.A., Dorrance, A.E. 2007. Evaluation of *Fusarium graminearum* associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. *Plant Dis*, 91, 1155-1160.
- Brown, J. F., & Ogle, H. J. 1997. Plant pathogens and plant diseases. Armidale, Australia: Rockvale Publications.
- Bonfim, K., Farias, C. J., Nogueira, O. P. L. E., Érica A. Mendes, A. E and Aragão L. F. J. 2007. RNAi-Mediated Resistance to *Bean golden mosaic virus* in Genetically Engineered Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). The American Phytopathological Society. MPMI Vol. 20, No. 6, pp. 717–726.
- Buchenauer, H. 1987. Mechanism of action of triazolyl fungicides and related compounds. In: Lyr H, (Ed.) Modern selective fungicides. Properties, applications and mechanism of action. New York, US. Longman Scientific & Technical pp. 205-231.
- Bushnell, W.R. 2001. What is known about infection pathways in *Fusarium* head blight. In: S.M. Canty, J. Lewis, L. Siler, R.W. Ward, eds. National *Fusarium* head blight forum proceedings. Erlanger, KY, USA: US Wheat & Barley Scab Initiative, 105.
- Chen, W.X., Kastner, C., Nowara, D., Oliveira-Garcia E., Rutten, T., Zhao, Y.S. 2016. Host-induced silencing of *Fusarium culmorum* genes protects wheat from infection. *Journal of Experimental Botany*, 67, 4979–4991.
- Cheng, W., Song, X.S., Li, H.P., Cao, L.H., Sun, K., Qiu, X.L., X.u, Y.B., Yang, P., Huang, T., Zhang, J.B., Qu, B. and Liao, Y.C. 2015. Host-induced gene silencing of an essential *chitin synthase* gene confers durable resistance to *Fusarium* head blight and seedling blight in wheat. *Plant Biotechnology Journal*. 13, pp. 1335–1345.
- Chennupati, P., Seguin P., Liu W. 2011. Effects of high temperature stress at different development stages on soybean isoflavone and tocopherol concentrations. *J. Agric. Food Chem.* 59 13081–13088.
- Choi, J. Y., Podust, L. M., Roush, W. R. 2014. Drug strategies targeting *CYP51* in neglected tropical diseases. *Chemical Reviews*, v. 114, p. 11242-11271.
- Christou, P., Swain, W.F., Yang, N., McCabe, D.E. 1989. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:7500-7504.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). 2019. Séries históricas de produção de grãos. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras?start=20>>. Acesso em: 27 ene. 2020.

- Cogoni, C., Irelan, J.T., Schumacher, M., Schmidhauser, T.J., Selker, E.U., Macino, G. 1996. Transgene silencing of the *ai-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J* 15:3153-3163.
- Cools, H.J and Fraaije, B.A. 2008. Are azole fungicides losing ground against *Septoria* wheat disease? Resistance mechanisms in *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag Sci.* 64(7):681–684.
- Csorba, T., Pantaleo, V., Burgyan, J. 2009. RNA silencing: An antiviral mechanism. *Adv. Virus Res.* 75, 35–71.
- Danielson, G.A., Nelson, B.D., Helms, T.C. 2004. Effect of *Sclerotinia* stem rot on yield of soybean inoculated at different growth stages. *Plant*, 88:297-300.
- Daly, J.M. 1984. The role of recognition in plant disease. *Annu Rev Phytopathol* 22:273–3
- Deng, S., Xu, J., Liu, J., Kim, S.H., Shi, S., Chua, N.H. 2015. JM24 binds to *RDR2* and is required for the basal level transcription of silenced loci in *Arabidopsis*. *Plant J*, 83, 770–782.
- De Cleene, M. and De Ley, J. 1976. The host range of crown gall. *The Botanical Review*, 42(4), 389-466.
- Diguistini, S., Wang, Y., Liao, N. Y., Taylor, G., Tanguay, P., Feau, N., Henrissat, B., Chan, S. K., Hesse-Orce, U., Alamouti, S. M., Tsui, C. K., Docking, R. T., Levasseur, A., Haridas, S., Robertson, G., Birol, I., Holt, R. A., Marra, M. A., Hamelin, R. C., Hirst, M., Breuil, C. 2011. Genome and transcriptome analyses of the mountain pine beetle-fungal symbiont *Grosmannia clavigera*, a lodgepole pine pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(6), 2504–2509.
- Ding, S. 2010. RNA-based antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 10, 632–644.
- Derbyshire, M.C. and Denton-Giles, M. 2016. The control of *sclerotinia* stem rot on oilseed rape (*Brassica napus*): current practices and future opportunities. *Plant Pathol.* 65, 859–87.
- Dou, T., Shao, X., Hu, C., Liu, S., Sheng, O., Bi, F., Deng, G., Ding, L., Li, C., Dong, T., Gao, H., He, W., Peng, X., Zhang, S., Huo, H., Yang, Q., Yi, G. 2019. Host-induced gene silencing of *Foc* TR4 *ERG6/11* genes exhibits superior resistance to *Fusarium* wilt of banana. *Plant Biotechnol J.*
- Eamens, A., Wang, M.B., Smith, N.A. and Waterhouse, P.M. 2008. RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiology*, 147, 456–468.

- Edwards, K., JOHNSTONE, C., THOMPSON, C. A. 1991. Simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*. v. 19, n. 6, p. 1349.
- Ellis, M.L., Broders, K.D., Paul, P.A., Dorrance, A.E. 2011. Infection of soybean seed by *Fusarium graminearum* and effect of seed treatments on disease under controlled conditions. *Plant Dis* 95:401–407.
- Escobar, M.A., Civerolo, E.L., Summerfelt, K.R. and Dandekar, A.M. 2001. RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98, 13437–13442.
- Fairbairn, D.J., Cavallaro, A.S., Bernard, M., Mahalinga-Iyer, J., Graham, M.W. and Botella, J.R. 2007 Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes. *Planta*, 226, 1525–1533.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391, (6669), 806-811.
- Garg, H., Li, H., Sivasithamparam, K., Kuo, J., Barbetti, M. J. 2010. The infection processes of *Sclerotinia sclerotiorum* in cotyledon tissue of a resistant and a susceptible genotype of *Brassica napus* *Ann. Bot.*, 106, pp. 897-908.
- Gadher, P., Mercer, E., Baldwin, B., Wiggins, T. 1983. A comparison of the potency of some fungicides as inhibitors of sterol 14-demethylation. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 19: 1-10.
- Gelvin, S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 16–37.
- Gelvin, S.B. 2010a. Finding a way to the nucleus. *Curr Opin Microbiol* 13:53-58.
- Gelvin, S.B. 2010b. Plant proteins involved in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Annu Rev Phytopathol* 48:45-68.
- Ghag, S.B., Shekhawat, U.K., Ganapathi. T.R. 2014. Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium* wilt in banana. *Plant Biotechnol J*. 12 (5):541–553.
- Gilbert, M.K., Majumdar, R.M., Rajasekaran, K., Chen, Z.Y., Wei, Q., Sickler, C.M., Lebar, M.D., Cary, J.W., Frame, B.R., Wang, K. 2018. RNA interference-based silencing of the alpha-amylase (*amy1*) gene in *Aspergillus flavus* decreases fungal growth and aflatoxin production in maize kernels. *Planta* 247:1465–1473.



- Govindarajulu, M., Epstein, L., Wroblewski, T., Micheltore, R.W. 2015. Host-induced gene silencing inhibits the biotrophic pathogen causing downy *mildew* of lettuce. *Plant Biotechnology Journal* 13, 875–883.
- Guo, Q., Liu Q., Smith, N.A., Liang, G., & Wang, M. B. 2016. RNA Silencing in Plants: Mechanisms, Technologies and Applications in Horticultural Crops. *Current genomics*, 17(6), 476-489.
- Guo, Z., Li, Y. & Ding, S. 2019. Small RNA-based antimicrobial immunity. *Nat Rev Immunol.* 19, 31–44.
- Guozhong, H., Rex, A., Davis, E.L., Baum, T.J., Hussey, R.S. 2006. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:14302–14306.
- Gutierrez-Gonzalez, J.J., Guttikonda. S.K., Tran., L.S, Aldrich, D.L., Zhong, R., Yu, O., Nguyen, H.T., Sleper, D.A. 2010. Differential expression of isoflavone biosynthetic genes in soybean during water deficits. *Plant Cell Physiol* 51:936–948.
- Haag, C., Steuten, B. and Feldbrügge, M. 2015. Membrane-coupled mRNA trafficking in fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 69, 265–281.
- Han, L. and Luan, Y.S. 2015. Horizontal transfer of small RNAs to and from plants. *Front. Plant Sci.* 6:1113.
- Hansen, G. & Wright, M. S. 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends in Plant Science*, 4(6), 226-231.
- Harper, G.E., Frampton, C.M., Stewart, A. 2002. Factors influencing survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* in New Zealand soils. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 30, 29–35.
- Hartman, G.L., Huang, Y.H., Nelson, R.L., Noel, G.R. 1997. Germplasm evaluation of *Glycine max* for resistance to *Fusarium solani*, the causal organism of sudden death syndrome. *Plant Dis* 81:515–518.
- Hartman, G.L., Leandro, L.F., Rupe, J.C. 2015b. Sudden death syndrome. Pages 88-90 in: *Compendium of Soybean Diseases*, 5th ed. Hartman, G.; Rupe, J. L.; Domier, L.; Sikora, E.; Steffey, K.; Davis, J. eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Harvey, J.J.W., Lewsey, M.G., Patel, K. Westwood, J., Heimstädt, S., Carr, J.P., Baulcombe, D.C. 2011. An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS one.* 6, e14639.

- Hashmi, R. Y., Bond, J.P., Schmidt, M. E., Klein, J. H. 2005. A temperature-controlled water bath method for evaluating soybean reaction to Sudden Death Syndrome (SDS). Online. Plant Health Progress.
- Hernandez, I., Chacon, O., Rodriguez, R., Portieles, R., Pujol, Y.L.M. and Borrás-Hidalgo, O. 2009. Black shank resistant tobacco by silencing of glutathione S-transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 387, 300–304.
- Hinchee, M.A.W., Ward, D.V.C., Newell, C.A., McDonnell, R.E., Sato, S.J., Gasser, C.S., Fischhoff, D.A. Re, D.B., Fraley, R.T. and Horsch, R.B. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/Technol.* 6: 915–922.
- Hollomon, D. 2017. Does agricultural use of azole fungicides contribute to resistance in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*? *Pest Manag Sci* 73:1987–1993.
- Hu, Q., Niu, Y., Zhang, K., Liu, Y., Zhou, X. 2011. Virus-derived transgenes expressing hairpin RNA give immunity to Tobacco mosaic virus and Cucumber mosaic virus. *Viol. J.* 8, 41.
- Hu, Z., Parekh, U., Maruta, N., Trusov, Y. and Botella, R. J. 2015. Down-regulation of *Fusarium oxysporum* endogenous genes by Host-Delivered RNA interference enhances disease resistance. *Front. Chem.*, Volume 3.
- Huang, G. Z., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J., and Hussey, R. S. 2006. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 14302–14306.
- Jahan, S.N., Åsman, A.K., Corcoran, P., Fogelqvist, J., Vetukuri, R.R., Dixelius, C. 2015. Plant-mediated gene silencing restricts growth of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *J Exp Bot* 66:2785–2794.
- Jamaux, I., Gelie, B., Lamarque, C. 1995. Early stages of infection of rapeseed petals and leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* revealed by scanning electron-microscopy *Plant Pathol.*, 44 , pp. 22-30.
- Jochl, C., Loh, E., Ploner, A., Haas, H. and Huttenhofer, A. 2009. Development-dependent scavenging of nucleic acids in the filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *RNA Biol.* 6, 179–186.
- Ju, S., Mu J., Dokland T., Zhuang X., Wang, Q., Jiang, H., Xiang X., Deng ZB., Wang B., Zhang L., Roth M.; Welti R., Mobley J.; Jun Y., Miller D.; Zhang HG. 2013. Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis. *Mol. Ther.* 21. 1345–1357.

- Kabbage, M., Yarden, O. and Dickman, M.B. 2015. Pathogenic attributes of: switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. *Plant Science*, 233, 53– 60.
- Kato, T., Tanaka, S., Ueda, M., Kawase, Y. 1975. Inhibition of sterol biosynthesis in *Monilinia fructigena* by the fungicide, S-1358. *Agricultural and Biological Chemistry* 39: 169-174.
- Kazi, S., Shultz, J., Bashir, R., Afzal, J., Njiti, V., Lightfoot, D.A. 2008. Separate loci underlie resistance to soybean sudden death syndrome in ‘Hartwig’ by ‘Flyer’. *Theor Appl Genet* 116, 967–977.
- Kelly, S. and Kelly, D. 2013. Microbial cytochromes P450: biodiversity and biotechnology. Where do cytochromes P450 come from, what do they do and what can they do for us. *Philosophical transactions of the royal society B* 368: 20120476.
- Khatri, M. and Rajam, M. V. 2007. Targeting polyamines of *Aspergillus nidulans* by siRNA specific to fungal ornithine decarboxylase gene. *Med. Mycol.* 45, 211–220.
- Knip, M., Constantin, M. E. and Thordal-Christensen, H. 2014. Trans-kingdom cross talk: small RNAs on the move. *PLoS Genet.* 10:e1004602. doi: 10.1371/journal.pgen.1004602.
- Koch, A., Kumar, N., Weber, L., Keller, H., Imani, J., Kogel, K, H. 2013. Host-induced gene silencing of cytochrome *P450* lanosterol C14 $\alpha$ -demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 19324–19329.
- Kohli, A., Melendi, P. G., Abranches, R., Capell, T., Stoger, E., & Christou, P. 2006. The Quest to Understand the Basis and Mechanisms that Control Expression of Introduced Transgenes in Crop Plants. *Plant signaling & behavior*, 1(4), 185–195.
- Lewandowski, S.M., Bushnell, W.R., Evans, C.K. 2006. Distribution of mycelial colonies and lesions in field-grown barley inoculated with *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 96: 567– 581.
- Li, J., Todd, T.C., Oakley, T.R., Lee, J. and Trick, H.N. 2010. Host-derived suppression of nematode reproductive and fitness genes decreases fecundity of *Heterodera glycines Ichinohe*. *Planta*, 232, 775–785.
- Liu, B., Chen, C., Lian Y., Chen, J., Chen, X. 2015. Long-term change of wet and dry climatic conditions in the southwest karst area of China. *Glob. Planet. Change* 127 1–11.
- Luo, C.X. and Schnabel, G. 2008a. The cytochrome P450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase gene is a demethylation inhibitor fungicide resistance determinant in *Monilinia fructicola* field isolates from Georgia. *Applied and environmental microbiology* 74: 359- 366.

- Lupetti A., Danesi R., Campa M., Del Tacca M., Kelly S. 2002. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med* 8:76–81.
- Machado, A.K., Brown, N.A., Urban, M., Kanyuka, K., Hammond-Kosack, K.E. 2018. RNAi as an emerging approach to control *Fusarium* head blight disease and mycotoxin contamination in cereals. *Pest Manag. Sci.* 74, 790–799.
- Majumdar, R., Rajasekaran, K. and Cary, J.W. 2017. RNA Interference (RNAi) as a Potential Tool for Control of Mycotoxin Contamination in Crop Plants: Concepts and Considerations. *Front. Plant Sci.* 8:200.
- Masanga, J.O., Matheka, J.M., Omer, R.A., Ommeh, S.C., Monda, E.O., Alakonya, A.E. 2015. Downregulation of transcription factor *afIR* in *Aspergillus flavus* confers reduction to aflatoxin accumulation in transgenic maize with alteration of host plant architecture. *Plant Cell Rep* 34:1379–1387.
- Mao, Y., Cai, W., Wang, J., Hong, G., Tao, X., Wang, L., Huang, Y., Chen, X. 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotechnol.* 25, 1307–1313.
- Mao, Y.B., Xue, X.Y., Tao, X.Y., Yang, C.Q., Wang, L.J. and Chen, X.Y. 2013. Cysteine protease enhances plant-mediated bollworm RNA interference. *Plant Mol. Biol.*, 83, 119–129.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (AGROSTAT). 2019. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/AGROSTAT.html>. Acesso em: 27 Jun. 2019.
- Melnyk, W.C., Molnar, A. and Baulcombe C. D. 2011. Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *The EMBO Journal.* 30, 3553–3563.
- Mu J., Zhuang X., Wang Q., Jiang H., Deng ZB., Wang B., Zhang L., Kakar S., Jun Y., Miller D., Zhang HG. 2014. Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 1561–1573.
- Muhammad, T., Zhang, F., Zhang, Y., Liang, Y. 2019. RNA Interference: A Natural Immune System of Plants to Counteract Biotic Stressors Cells. 8(1): 38.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. 1990. Introduction of a chimeric *chalcone synthase* gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2:279-289.
- Navaud, O., Barbacci, A., Taylor, A., Clarkson, J.P. and Raffaele, S. 2018. Shifts in diversification rates and host jump frequencies shaped the diversity of host range among *Sclerotiniaceae* fungal plant pathogens. *Mol. Ecol.* 27, 1309– 1323.

- Navi, S.S., and Yang, X.B. 2008. Foliar symptom expression in association with early infection and xylem colonization by *Fusarium virguliforme* (formerly *F. solani* f. sp. *glycines*), the causal agent of soybean sudden death syndrome. Online Plant Health Progress 1-13.
- Niu, J.H., Jian, H., Xu, J.M., Chen, C.D. and Guo, Q.X. 2012. RNAi silencing of the *Meloidogyne incognita* *Rpn7* gene reduces nematode parasitic success. Eur. J. Plant Pathol., 134, 131–144.
- Nowara, D., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., Ridout, C., Douchkov, D., Hensel, G., Kumlehn, J., Schweizer, P. 2010. HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. The Plant Cell 22, 3130–41.
- Nunes, A.C.S., Vianna, G.R., Cuneo, F., Amaya-Farfán, J., Capdeville, G., Rech, E.L., Aragão, F.J.L. 2006. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-i-phosphate syntase gene (*GmMIPS1*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. Plant 224, 125-132.
- Nunes, C.C., Dean, R.A. 2012. Host-induced gene silencing: A tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies. Mol Plant Pathol 13(5):519–529.
- O'Donnell, K., Sink S., Luque, A., Colletto, A., Biasoli, M., Lenzi, L., Salas, G., González, V., Ploper, LD., Formento, N., Pioli, RN., Aoki, T., Yang, XB., Sarver, BA. 2010. Soybean sudden death syndrome species within North and South America revealed by multilocus genotyping. Phytopathology 100: 58–71.
- Oliver, R.P. and Hewitt, H.G. 2014. Fungicides in crop protection. Second Ed. Oxfordshire, UK. CAB International.
- Panwar, V., McCallum, B. and Bakkeren, G. 2013. Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the Barley stripe mosaic virus. Plant Mol. Biol. 81, 595–608.
- Panwar, V., McCallum, B., Jordan, M., Loewen, M., Fobert, P., McCartney, C. 2016. RNA silencing approaches for identifying pathogenicity and virulence elements towards engineering crop resistance to plant pathogenic fungi. CAB Rev 11:1–13.
- Panwar, V., Jordan, M., McCallum, B., Bakkeren, G. 2018. Host-induced silencing of essential genes in *Puccinia triticina* through transgenic expression of RNAi sequences reduces severity of leaf rust infection in wheat. Plant Biotechnol J 16:1013–1023.
- Papolu, P.K., Gantasala, N.P., Kamaraju, D., Banakar, P., Sreevathsa, R. and Rao, U. 2013. Utility of host delivered RNAi of two FMRF amide like peptides, *flp-14* and *flp-18*, for the management of root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. PLoS One, 8, e80603.

- Parks, L. W. & CASEY, W. M. 1995. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.49, p.95-16.
- Pitino, M., Coleman, A.D., Maffei, M.E., Ridout, C.J. and Hogenhout, S.A. 2011. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PLoS One*, 6, e25709.
- Pitzschke, A. and Hirt, H. 2010. New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *EMBO J* 29:1021-1032.
- Pliego, C., Nowara, D., Bonciani, G., Gheorghe, D.M., Xu, R., Surana, P., Whigham, E., Nettleton, D., Bogdanove, A.J., Wise, R.P., Schweizer, P., Bindschedler, L.V., Spanu, P.D. 2013. Host-induced gene silencing in barley powdery mildew reveals a class of ribonuclease-like effectors. *Mol Plant Microbe Interact.* 26(6):633-42.
- Perez-Nadales, E., Almeida, N. M.F., Baldin, C. 2014. Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genet Biol.* 70C:42–67.
- Pryce-Jones, E., Carver, T.I.M., Gurr, S.J. 1999. The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis f.sp. hordei*. *Physiol Mol Plant P*, 55:175–82.
- Pudake, R, N., Swaminathan, S., Sahu, B.B., Leandro, L. F., Bhattacharyya, M.K. 2013. Investigation of the *Fusarium virguliforme fvtox1* mutants revealed that the *FvTox1* toxin is involved in foliar sudden death syndrome development in soybean. *Curr. Genet.* 59:107-117.
- Qi, T., Zhu, X., Tan, C., Liu, P., Guo, J., Kang, Z., Guo, J. 2018. Host-induced gene silencing of an important pathogenicity factor *PsCPK1* in *Puccinia striiformis f. sp. tritici* enhances resistance of wheat to stripe rust. *Plant Biotechnol J* 16:797–807
- Raimondo, S., Naselli F., Fontana, S., Monteleone, F., Lo Dico, A., Saieva, L., Zito G., Flugy, A., Manno, M., Di Bella, M.A., De Leo, G., Alessandro, R. 2015. Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death. *Oncotarget* 6, 19514–19527.
- Reis, E.M, Reis. A.C, Carmona, M.A. 2010. Manual de fungicidas: guia para controle químico de doenças de plantas. 6o Ed. Passo Fundo, Brasil. UPF.
- Riechen, J. 2007. Establishment of broad-spectrum resistance against *Blumeria graminis f. sp. tritici* in *Triticum aestivum* by RNAi-mediated knock-down of *MLO*. *J. Verbrauch. Lebensm.* 2, 120.
- Romano, N. and Macino, G. 1992. Quelling transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6:3343-3353.

- Russo, M.L., S. Pelizza, M., Vianna, N., Allegrucci, M.N., Cabello, A.V., Toledo, C. Mourellos., A.C. Scorsetti. 2019. Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield J. King Saud Univ.-Sci.31: 728–736
- Schenkman, H., Grein K., Yoshida, Y. 1993. Lanosterol 14a-demethylase (cytochrome P45014DM) *Cytochromes P450*, eds Schenkman H, Grein K (Springer, Berlin, Germany), pp 627–639.
- Schmitz, H.K., Medeiros, C.A., Craig, I.R., Stammler, G. 2014. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. Pest management science, v.70, p. 378-388.
- Shapiro, R.S., Robbins, N., Cowen, L.E. 2011. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. Microbiology and Molecular Biology Reviews 75: 213-267.
- Shapulatov, U., Van Hoogdalem, M., Schreuder, M., Bouwmeester, H., Abdurakhmonov, I.Y., Van der Krol, A. R. 2018. Functional intron-derived miRNAs and host-gene expression in plants. Plant methods, 14, 83.
- Sheehan, D., Hitchcock, C.A., Sibley, C.M. 1999. Current and emerging azole antifungal agents. Clinical microbiology reviews, v. 12, n. 1, p. 40-79.
- Sindhu, A.S., Maier, T.R., Mitchum, M.G., Hussey, R.S. and Davis, E.L. 2009. Effective and specific in planta RNAi in cyst nematodes: expression interference of four parasitism genes reduces parasitic success. J. Exp. Bot., 60, 315–324.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B, Stoutjesdijk, P.A, Green, A.G., Waterhouse, P.M. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. Nature 407, 319–320.
- Somers, D.A., Samac, D.A., Olhoft, P.M. 2003. Recent advances in legume transformation. Plant Physiol., 131: 892-899.
- Song, Y., Thomma, B.P.H.J. 2018. Host-induced gene silencing compromises *Verticillium* wilt in tomato and *Arabidopsis*. Mol Plant Pathol 2018:77–89.
- Souza, M. V., Machado, J. C., Pfenning, L. H., Kawasaki, V. H., Araújo, D. V., Silva. A. A., Neto, A. M. 2008. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. Tropical Plant Pathology, Lavras, v. 33, n. 1, p. 41-48.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill, New York.

- Steeves, R.M., Todd, T.C., Essig, J.S. and Trick, H.N. 2006. Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction. *Funct. Plant Biol.*, 33, 991–999.
- Stephens, P.A., Nickell, C.D, Moots, C. K., Lim, S.M, 1993. Relationship between field and greenhouse reactions of soybean to *Fusarium solani*. *Plant Dis.* 77,163-166.
- Tao, X.Y., Xue, X.Y., Huang, Y.P., Chen, X.Y. and Mao, Y.B. 2012. Gossypol-enhanced *P450* gene pool contributes to cotton bollworm tolerance to a pyrethroid insecticide. *Mol. Ecol.*, 21, 4371–4385.
- Tariq, V.N and Jeffries, P. 1986. Ultrastructure of penetration of *Phaseolus spp.* by *Sclerotinia sclerotiorum* Can. J. Bot., pp. 2909-2915.
- Thakare, D., Zhang, J., Wing, R.A., Cotty, P.J., Schmidt, M.A. 2017. Aflatoxin-free transgenic maize using host-induced gene silencing. *Sci Adv* 3:e1602382.
- Tinoco, M. L. P., Dias, B. B. A., Dall’astta, R. C., Pamphile, J. A., Aragão, F. J. L. 2010. In vivo trans-specific gene silencing in fungal cells by in planta expression of a double-strand RNA. *BMC Biology*, v. 8, n. 27.
- Tian, B., Li, J., Oakley, T.R., Todd, T.C., Trick, H.N. 2016. Host-Derived Artificial MicroRNA as an Alternative Method to Improve Soybean Resistance to Soybean Cyst Nematode. *Genes* 7, 122.
- Tian, Y., Meng, Y., Zhao, X., Chen, X., Ma, H., Xu, S., Huang, L., Kang, Z., Zhan, Gangming. 2019. Trade-Off Between Triadimefon Sensitivity and Pathogenicity in a Selfed Sexual Population of *Puccinia striiformis f. sp. Tritici*. *Frontiers in Microbiology* 10, 2729.
- Tomilov, A. A., Tomilova, N. B., Wroblewski, T., Michelmore, R. and Yoder, J.I. 2008. Transspecific gene silencing between host and parasitic plants. *Plant J.*, 56, 389–397.
- Travadon, R., Smith, M.E., Fujiyoshi, P. 2012. Inferring dispersal patterns of the generalist root fungus *Armillaria mellea*. *New Phytol*, 193:959–69.
- Tucker, S.L. and Talbot, N.J. 2001. Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol*, 39:385–417.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J., and Lotvall, J. O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659.
- Van Der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N. and Stuitje, A. R. 1990. Flavonoid genes in Petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, 2:291-299.



- Voinnet, O. and Baulcombe, D.C. 1997. Systemic signalling in gene silencing. *Nature*, 389, 553.
- Vollmann, J. 2016. Soybean versus other food grain legumes: A critical appraisal of the United Nations International year of pulse 2016. *Journal of Land Management, Food and Environment* 67(1): 17-24.
- Walawage, S.L., Britton, M.T., Leslie, C.A., Uratsu, S.L., Li, Y. and Dandekar, A.M. 2013. Stacking resistance to crown gall and nematodes in walnut rootstocks. *BMC Genomics*, 4, 1–13.
- Wang, M., Weiberg, A., Lin, F.M, Thomma, B.P.H.J., Huang, H.D., Jin, H. 2016. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nat Plants* 2: 16151.
- Wang, Z., Bao, L.L., Zhao, F.Y., Tang, M.Q., Chen, T., Li, Y., Wang, B.X., Fu, B., Fang, H., Li, G.Y. 2019. BnaMPK3 is a key regulator of defense responses to the devastating plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape. *Front. Plant Sci.* 10, 1–18.
- Wang, M., Dean, A.R. 2020. Movement of small RNAs in and between plants and fungi. *Molecular Plant Pathology*, 21:589–601.
- Wanjiru, W.M., Kang, Z., Buchenauer, H. 2002. Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. *European Journal of Plant Pathology* 108: 803– 810.
- Wrather, J.A., Stienstra, W.C., Koenning, S.R. 2001. Soybean disease loss estimates for the United States from 1996-1998. *Can. J. Plant Pathology* 23,122-131.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W., Wang, M.B. A. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA.* 95 (23): 13959-13964.
- Willetts, H. J. and Wong, J.A.1980. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *Botanical Review*, New York, v. 46, p. 101–165.
- Willbur, J., McCaghey, M., Kabbage, M., Smith, L. D. 2019. An overview of the pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. *Trop. plant pathol.* 44, 3–1.
- Wegulo, S. N., Baenziger, P.S., Nopsa, J.H, Bockus, W.W., Hallen-Adams, H, 2015. Management of *Fusarium* head blight of wheat and barley. *Crop Prot.* 73, 100 107.

- Wesley, S.V, Helliwell, C.A, Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., Waterhouse, P.M. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 6, 581-90.
- Wrather, A., Shannon, G., Balardin, R., Carregal, L., Escobar, R. 2010. Effect of diseases on soybean yield in the top eight producing countries in 2006. *Plant Health Progress*.
- Xiong, Y., Zeng, H., Zhang, Y., Xu, D. and Qiu, D. 2013. Silencing the HaHR3 gene by transgenic plant-mediated RNAi to disrupt *Helicoverpa armigera* development. *Int. J. Biol. Sci.*, 9, 370–381.
- Xue, A.G., Cober, E., Voldeng, H.D., Babcock, C., Clear, R.M. 2007. Evaluation of the pathogenicity of *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum* on soybean seedlings under controlled conditions. *Canadian Journal of Plant Pathology* 29, 35–40.
- Xue, B., Hamamouch, N., Li, C., Huang, G. and Hussey, R.S. 2013. The 8D05 parasitism gene of *Meloidogyne incognita* is required for successful infection of host roots. *Phytopathology*, 103, 175–181.
- Xu, L., Duan, X., Lv, Y., Zhang, X., Nie, Z., Xie, C., Ni, Z. and Liang, R. 2014. Silencing of an aphid carboxylesterase gene by use of plant-mediated RNAi impairs *Sitobion avenae* tolerance of Phoxim insecticides. *Transgenic Res.*, 23, 389–396.
- Yang, Y., Jittayasothorn, Y., Chronis, D., Wang, X., Cousins, P. and Zhong, G.Y. 2013. Molecular characteristics and efficacy of 16D10 siRNAs in inhibiting root-knot nematode infection in transgenic grape hairy roots. *PLoS One*, 8, e69463.
- Yin, C., Jurgenson, J.E. and Hulbert, S.H. 2011. Development of a host-induced RNAi system in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis f. sp. tritici*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24, 554–561.
- Yoo, B.C., Kragler, F., Varkonyi, G.E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M. 2004. A systemic small RNA signaling system in plants. *The Plant Cell*, 16, 1979–2000.
- Yoshida, Y. 1993. Lanosterol 14a-demethylase (cytochrome P45014DM) In: Schenkman, H. and Grein, K. editors. *Cytochromes P450*. Berlin, Germany: Springer, 627–639.
- Youssef, R.M., Kim, K.H., Haroon, S.A. and Matthews, B.F. 2013. Post-transcriptional gene silencing of the gene encoding aldolase from soybean cyst nematode by transformed soybean roots. *Exp. Parasitol.*, 134, 266–274.

- Zeng, P., Vadnais, D.A., Zhang, Z. 2004. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. Plant Cell Rep 22, 478–482.
- Zha, W., Peng, X., Chen, R., Du, B., Zhu, L. and He, G. 2011. Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. PLoS One, 6, 1–11.
- Zhang, H., Guo, J., Voegelé, R.T., Zhang, J.S., Duan, Y.H., Luo, H.Y., Kang, Z.S. 2012. Functional characterization of calcineurin homologs *PsCNA1/ PsCNB1* in *Puccinia striiformis f. sp. tritici* using a host-induced RNAi system. PLoS One 7, e49262. Doi:10.1371/journal.pone.0049262.
- Zhang, T., Jin, Y., Zhao, J.H., Gao, F., Zhou, B. J., Fang, Y.Y. 2016. Host-induced gene silencing of the target gene in fungal cells confers effective resistance to the cotton wilt disease pathogen *Verticillium dahliae*. Mol. Plant 9, 939–942.
- Zhang, C., Zhao, X., Qu, Y., Teng, W., Qiu, L., Zheng, H., Wang, Z., Han, Y., Li, W. 2019. Loci and candidate genes in soybean that confer resistance to *Fusarium graminearum*. Theoretical and Applied Genetics.132:431–441.
- Zhao, X., Han, Y., Li Y., Liu D., Sun M., Zhao Y., Lv, C., Li D., Yang Z., Huang L., Teng, W., Qiu, L., Zheng, H., Li W. 2015. Loci and candidate gene identification for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* soybean (*Glycine max* L. Merr.) via association and linkage maps. The Plant Journal 82, 245–255.
- Zhou, B., Bailey, A., Niblett, C.L. & Qu, R. 2016. Control of brown patch (*Rhizoctonia solani*) in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) by host induced gene silencing. Plant Cell Reporter, 35, 791–802.
- Zhu, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J., Farrand, S.K. and Winans, S.C. 2000. The bases of crown gall tumorigenesis. J. Bacteriol., 182, 3885–3895.
- Zhu, L., Zhu, J., Liu, Z., Wang, Z., Zhou, C., Wang, H. 2017a. Host-induced gene silencing of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* pathogenicity genes mediated by the brome mosaic virus. Genes 8:241
- Zhu, X., Qi, T., Yang, Q., He, F., Tan, C., Ma, W., Voegelé, R.T., Kang, Z., Guo, J. 2017b. Host-induced gene silencing of the MAPKK gene PsFUZ7 confers stable resistance to wheat stripe rust. Plant Physiol 175:1853–1863.

## Anexo 1. Bioética e biossegurança



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
Universidade Estadual de Campinas  
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil  
Fone (19) 3521-6378. email: cpqib@unicamp.br



### DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada **"SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA RESISTENTE A FUNGOS VIA SILENCIAMENTO GÊNICO INDUZIDO PELO HOSPEDEIRO"**, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do(a) aluno(a): Cristobal Ervi Bautista Pérez

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do(a) orientador(a): J. Francisco Lima Aragão

Data: 15/12/2020

## Anexo 2. Artigo

Received: 3 August 2020 | Accepted: 2 October 2020

DOI: 10.1111/ppa.13299

### ORIGINAL ARTICLE

Plant Pathology  WILEY

# Host-induced gene silencing for engineering resistance to *Fusarium* in soybean

Cristobal E. B. Pérez<sup>1,2</sup>  | Glauca B. Cabral<sup>1</sup>  | Francisco J. L. Aragão<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, Brazil

#### Correspondence

Francisco J. L. Aragão, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte, 70770-917, Brasília, DF, Brazil.

Email: [francisco.aragao@embrapa.br](mailto:francisco.aragao@embrapa.br)

#### Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 307111/2018-0; Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

#### Abstract

Soybean is one of the most economically important crops in the world. Its production is affected by several fungal diseases, such as those caused by *Fusarium* spp., causing significant losses in yield and seed quality. Management interventions are limited, costly, and associated with environmental problems. Host resistance provides a more convenient and cost-effective approach. Host-induced gene silencing (HIGS) has been demonstrated to be an alternative strategy to engineer fungus resistance in plants. We have generated transgenic soybean lines with an intron-hairpin construction in order to express siRNA corresponding to the *CYP51B* gene from *Fusarium oxysporum*. Results showed the presence of siRNA corresponding to the *F. oxysporum* *CYP51B* gene in both leaves and roots of the transgenic lines. Plants (T<sub>3</sub> generation) were challenged against *F. oxysporum* and *F. graminearum*. Disease severity was evaluated and revealed resistance to *F. oxysporum* with one line, named 3.22, presenting no symptoms. In addition, transgenic lines presented better plant development (height and root growth) when compared to the nontransgenic line. Moreover, transgenic lines revealed better development when inoculated with *F. oxysporum*.

#### KEYWORDS

gene silencing, *Glycine max*, HIGS, plant genetic engineering

## 1 | INTRODUCTION

Soybean (*Glycine max*) is one of the most economically important crops in the world, having multiple uses and a high protein content, ranging from 35% to 52% (Vollmann, 2016). Brazil is the second largest producer, with 122 million tonnes cultivated on 36.7 million hectares (<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>). However, soybean production can be affected by various diseases and pests, including fungi, viruses, and nematodes (Hartman et al., 1999). Pathogenic fungi affect plants in leaves, stems, and roots and often cause the death of the plant, causing losses in yield and seed quality (Moscardi and Sosa-Gómez, 2007). The genus *Fusarium* causes several diseases in soybeans, which can include withering of the plant and sudden death syndrome, as well as diseases in the seeds and seedlings, and root rot (Broders et al., 2007; Nelson, 1999). There are few alternatives

available for chemical control of diseases caused by fungi, and pathogens are becoming tolerant to fungicides because they have been used extensively (Cools et al., 2012; Ma and Michailides, 2005). These facts reinforce the need for the development of efficient genetic strategies for the control of phytopathogens. One alternative for the production of fungus-resistant plants is gene silencing via RNA interference, with the help of genetic engineering for the design and construction of the vector to be used (Tian et al., 2016).

Host-induced gene silencing (HIGS) is a strategy in which genetically modified plants are generated to express small interfering RNAs (siRNAs) in order to silence vital fungal genes when the pathogen interacts with plant tissues. This phenomenon was demonstrated for the first time in the pathogenic fungus *Fusarium verticillioides*. Tobacco plants were engineered to silence the *gus* gene and inoculated with transgenic *F. verticillioides* transformed to express dsRNA corresponding to the *gus* gene. The transgene expression was specifically abolished in mycelial cells interacting with the transgenic

plants (Tinoco et al., 2010). In barley, HIGS was used to silence the gene *GFT1* from the fungus *Blumeria graminis*, and HIGS was used in banana to silence the gene *FTF1* from *F. oxysporum* (Ghag et al., 2014; Nowara et al., 2010).

HIGS strategies can be used for silencing genes coding for proteins that are targets for fungicides, such as tebuconazole, triadimefon, and prochloraz, with action on eburicol 14- $\alpha$ -demethylase (*CYP51*), inhibiting ergosterol synthesis and disrupting fungal membrane integrity (Yoshida, 1993). Liu et al. (2011) demonstrated that silencing genes (designated *CYP51A*, *CYP51B*, and *CYP51C*) that code for proteins that are targets for azole fungicides is efficient for the control of *Fusarium* spp. growth. Zheng et al. (2019) demonstrated that *F. oxysporum* mutants with deletion of *FoCYP51B*, but not *FoCYP51A* and *FoCYP51C*, were significantly retarded in hyphal growth. In addition, deletion of *FoCYP51A* led to increased sensitivity to 11 sterol demethylation inhibitor fungicides. In *F. graminearum*,  $\Delta$ FgCYP51B mutants presented blocked ascospore formation and accumulation of eburicol, while the deletion of the *FgCYP51A* gene increased fungal sensitivity to azoles (prochloraz, tebuconazole, and epoxiconazole; Fan et al., 2013). In addition, a *F. graminearum* mutant defective in *CYP51A* ( $\Delta$ CYP51A-5) was highly sensitive to triadimefon and propiconazole. Deletion of the *CYP51C* gene resulted in an increased sensitivity to tebuconazole, diniconazole, difenoconazole, flutriafol, and prochloraz (Chen et al., 2020). In wheat and *Arabidopsis thaliana*, HIGS has been applied to silence *F. graminearum* *CYP51* genes and shown to be an efficient strategy to reduce mycelial growth and fungal infection in plants (Ghag et al., 2014; Koch et al., 2013; Nowara et al., 2010).

Here we report the expression in soybean of small interfering RNA corresponding to a fragment of the *CYP51B* gene from *F. oxysporum* in genetically engineered plants. We hypothesized that the expression of these siRNAs would interfere in the pathogen's life cycle, and generate resistance to *F. oxysporum* and *F. graminearum*, causal agents of serious diseases in one of the world's most important crops, soybean.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | RNA interference vector and soybean genetic transformation

For the construction of the interference vector, the *bar* gene coding sequence from pCambia3300 was replaced by the mutated *ahas* coding sequence from *A. thaliana* (GenBank accession number NM114714.3, positions 208–2,220), between the *XhoI* restriction sites, generating pC3300Ahas. The intron-spliced hpRNA interfering cassette ( $\Delta$ CYP51) contained the *A. thaliana* *actin 2* promoter (GenBank accession number LR699757.1, positions 6,492,838–6,494,239), the intron from the *Flaveria trinervia* pyruvate orthophosphate dikinase (*pdh*) gene (GenBank accession number X79095.1, positions 7,914–8,658) and the *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase gene terminator (*nos*; GenBank accession

number MK078637.1, positions 1–253). The fragment from the *F. oxysporum* eburicol 14- $\alpha$ -demethylase (*CYP51B*) gene (GenBank accession number XM018376712.1, positions 754–1,255) was positioned in sense and antisense orientations flanking the *pdh* intron. The interfering cassette was synthesized by Epoch Life Science Inc. (USA) and cloned between the *PvuII* and *PmeI* restriction sites into the vector pC3300Ahas, generating the vector pFoCYP51AHAS (Figure 1a), used to genetically transform soybean (cv. BRS7980) via *Agrobacterium* according to Zhang et al. (1999), except that 600 nM imazapyr was used to select transformed plantlets.

### 2.2 | Screening of transgenic plants by PCR

The analyses of the T<sub>0</sub> to T<sub>3</sub> generation transformant lines were conducted by PCR carried out according to Bonfim et al. (2007) using the primer pair CYP51F (5'-CATCGGGTTGGGGAAGTAG-3')/CYP51R (5'-CTTCACGCCCTATCCACTC-3') to amplify a 148 bp fragment within the  $\Delta$ CYP51 cassette.

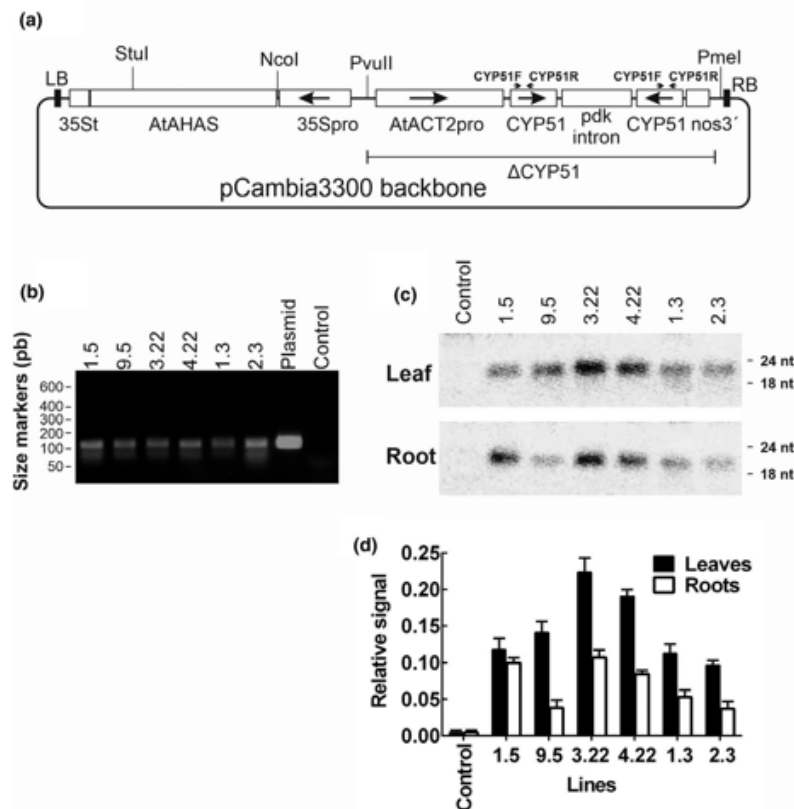
### 2.3 | Northern blot analysis for siRNA

Total RNA was isolated from leaves and roots by extraction with TRIzol (Thermo Fisher Scientific) as recommended by the manufacturer. Total RNA (50  $\mu$ g) was separated by 20% polyacrylamide gel electrophoresis with 7 M urea and Tris-borate-EDTA (TBE). The gel was stained with TBE containing ethidium bromide (0.5  $\mu$ g/ml), and photographed. RNAs were electroblotted to a BrightStar-Plus positively charged nylon membrane (Thermo Fisher Scientific), UV light fixed, and hybridized with a DNA probe corresponding to the 148 bp PCR fragment within the  $\Delta$ CYP51 cassette (described above). Probes were labelled with [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]-dCTP using the DecaLabel DNA Labeling Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Hybridization and post-hybridization washes were conducted as described (Yoo et al., 2004). Three oligomers (18, 24, and 44 nucleotides) were used as molecular size markers. The relative intensity of the bands was determined by analysing the band intensity using the Quantity One 1-D Analysis Software v. 4.6.3 (Bio-Rad). Relative quantification was done by comparing intensities of the siRNA bands in the six transgenic lines. These analyses were repeated three times.

### 2.4 | Plant inoculation with *F. oxysporum* and *F. graminearum* and symptom evaluation

For the challenge assays, *F. oxysporum* and *F. graminearum* (strains isolated from soybean in Distrito Federal (Brazil) and deposited in the LEG-Embrapa-Cenargen microorganism bank, under the numbers Fo003-2018 and Fg013/2019, respectively) were cultivated in potato dextrose agar (PDA), and incubated for 20 days at room temperature. After the incubation period, 10 ml of sterile distilled





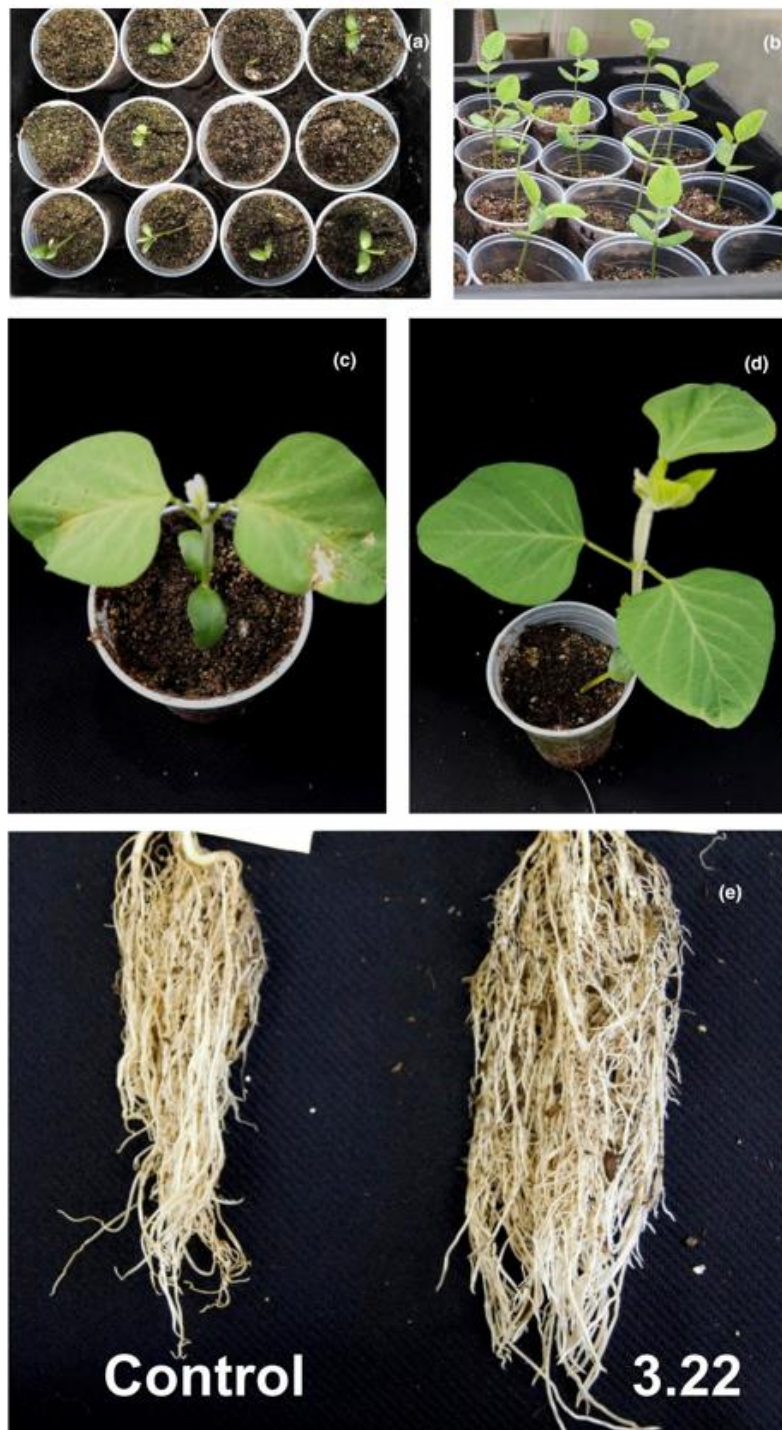
**FIGURE 1** Engineering soybean to express dsRNA for silencing *Fusarium CYP51B* gene. (a) Diagram representing the vector (pFoCYP51AHAS) used to transform soybean plants. A 502 bp fragment from the *F. oxysporum CYP51B* gene was positioned in sense and antisense orientations, flanking the *Flaveria trinervia pdk* intron, under the control of the *Arabidopsis thaliana* actin 2 promoter (AtACT2pro) for the construction of the intron-hairpin RNAi cassette ( $\Delta$ CYP51). The pFoCYP51AHAS vector also contains the mutated *A. thaliana ahas* gene (AtAHAS), under the control of the CaMV 35S promoter (35Spro), which confers tolerance to imidazolinones, used as selection. (b) PCR analysis carried out using the primers CYP51F and CYP51R confirmed the presence of the  $\Delta$ CYP51 cassette in six transgenic lines. (c) Northern blot analysis using the CYP51 probe (PCR-amplified fragment) for detection of the  $\Delta$ CYP51-corresponding siRNA (representative gel). (d) Relative quantification of the siRNA in the six transgenic lines. Data represent average  $\pm$  SE,  $n = 3$ . The control is a nontransgenic plant. nos3', *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase gene terminator; 35St, CaMV RNA terminator; 35Spro, CaMV 35S promoter; LB, left border sequence; RB, right border

water was added to the fungal plates, the spore mass was homogenized, and the suspension was filtered to remove fungal debris. The spore suspension was adjusted to  $5 \times 10^5$  spores/ml and used to inoculate 2 g of surface-disinfected seeds that were soaked in the spore suspension for 5 min and water drained off. Seeds were gas disinfected for 16 hr in a desiccator chamber with a tightly fitting lid within a fume hood, containing chlorine gas produced by mixing 100 ml of Clorox (6%–10% sodium hypochlorite adding 3.5 ml of 12 M HCl dropwise along the side of the beaker). After overnight exposure to chlorine gas, seeds were exposed to the air flow in a laminar flow hood for 30 min. Seeds were sown in 300 ml plastic cups (one seed each) containing autoclaved vermiculite and maintained under greenhouse conditions (average temperature of  $27 \pm 5$  °C). Germination was evaluated 10 days after seed planting (DASP) according to the following formula: germination rate (%) = (plants germinated after 10 days/number of seeds planted)  $\times$  100, and was

posteriorly analysed under a completely randomized design, and a significant difference of  $p \leq .05$ . Plant height and root dry weight were measured at 15 DASP. Disease severity was determined 15 DASP, using a visual disease rating based on a disease severity scale from 1 to 5 described by Hartman et al. (1997), which is based on symptoms in the aerial parts of the plants (leaves and cotyledons). Experiments were carried out with three replications in a completely randomized design, and the plot was represented by six cups. Experiments were repeated twice.

## 2.5 | Statistical analysis

The statistical analyses using the software SAS v. 9.0 were carried out by means of a completely randomized design, with three repetitions. Analysis of variance (ANOVA) was implemented to determine



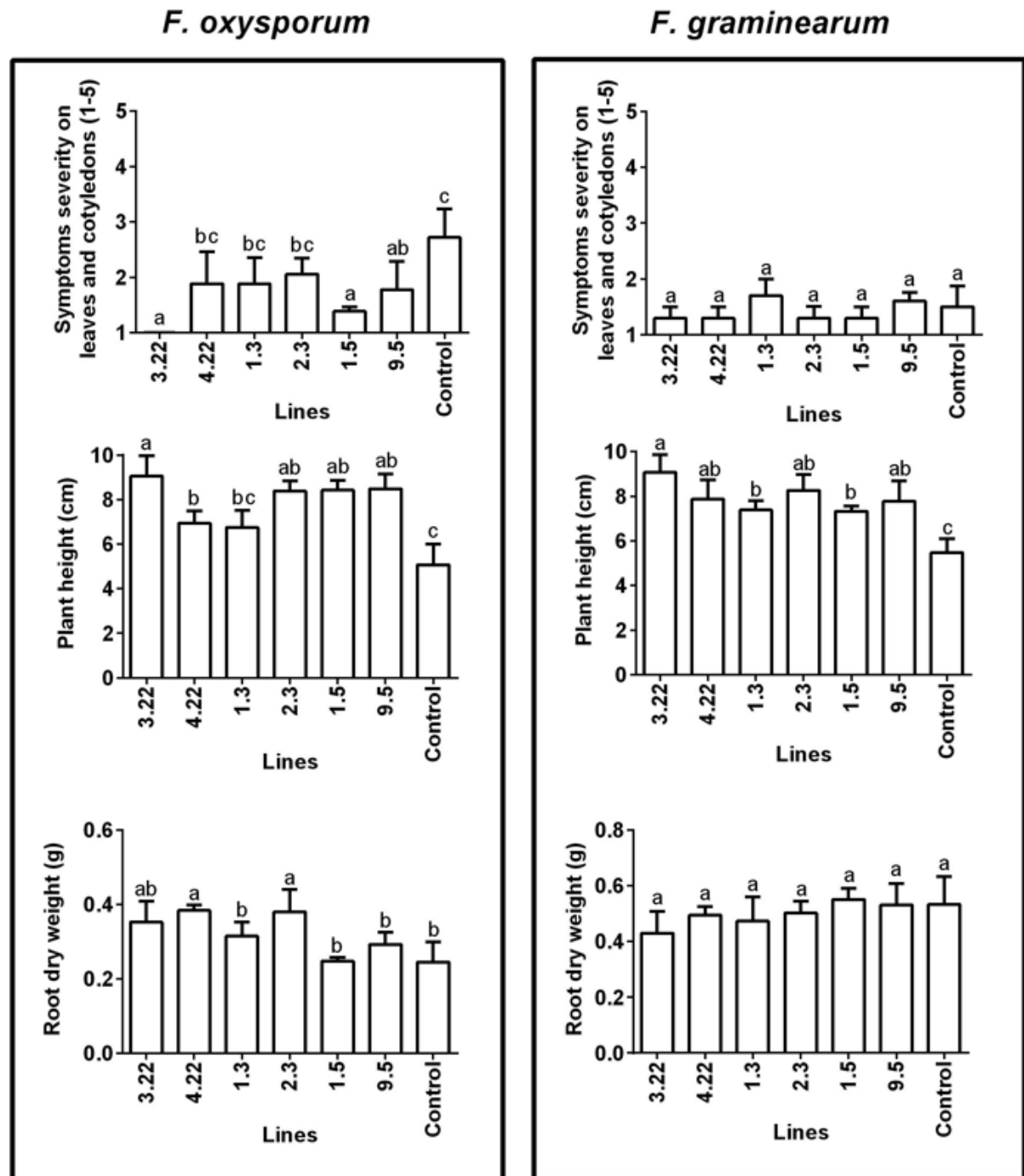
**FIGURE 2** Resistance response of transgenic soybean plants inoculated with *Fusarium oxysporum*. Effect on seed germination and plant development 10 and 15 days after fungal inoculation of nontransgenic (a) and transgenic (b) plants. Symptoms were observed 15 days after fungal inoculation on nontransgenic plants (c), while no visible symptoms were observed in the plants from the 3.22 transgenic line (d). (e) Effect of fungal inoculation on root development of transgenic (line 3.22) and nontransgenic (control) plants

the significant differences ( $p < .05$ ) among the evaluated lines followed by Duncan's test ( $p < .05$ ). Correlation analyses (relative amounts of siRNA expressed in roots and leaves versus symptom severity on leaves and cotyledons) were calculated using Pearson's correlation coefficient at 95% confidence interval.

### 3 | RESULTS

The cotyledon method was used to transform the soybean plants mediated by *A. tumefaciens*. The generated plantlets were acclimatized, transplanted to a greenhouse, and analysed by PCR for the





**FIGURE 3** Symptom severity on transgenic soybean lines 15 days after inoculation with *Fusarium oxysporum* or *F. graminearum*, and the effect on plant development, aerial parts (measured by plant height) and roots (measured by dry root weight). Bars with the same letters above do not differ by Duncan's test ( $p < .05$ ). Error bars represent standard deviation of two independent experiments ( $n = 6$ )

presence of the  $\Delta CYP51$  cassette (Figure 1a,b). From a total of 546 cocultured explants, six lines presented the transgene and were advanced to the  $T_3$  generation.

To detect the transgene-derived siRNAs by the expression of  $\Delta CYP51$ , a northern blot analysis was carried out using RNA isolated from leaves and roots from the transgenic soybean lines

(T<sub>3</sub> generation). Results showed the presence of *CYP51B* siRNAs in all six transgenic lines, highlighting lines 3.22 and 4.22 presenting an increased amount of accumulated siRNA in both leaves and roots (Figure 1c). No signal was observed in nontransgenic plants. Line 1.5 also presented higher accumulation of siRNA in roots (Figure 1d).

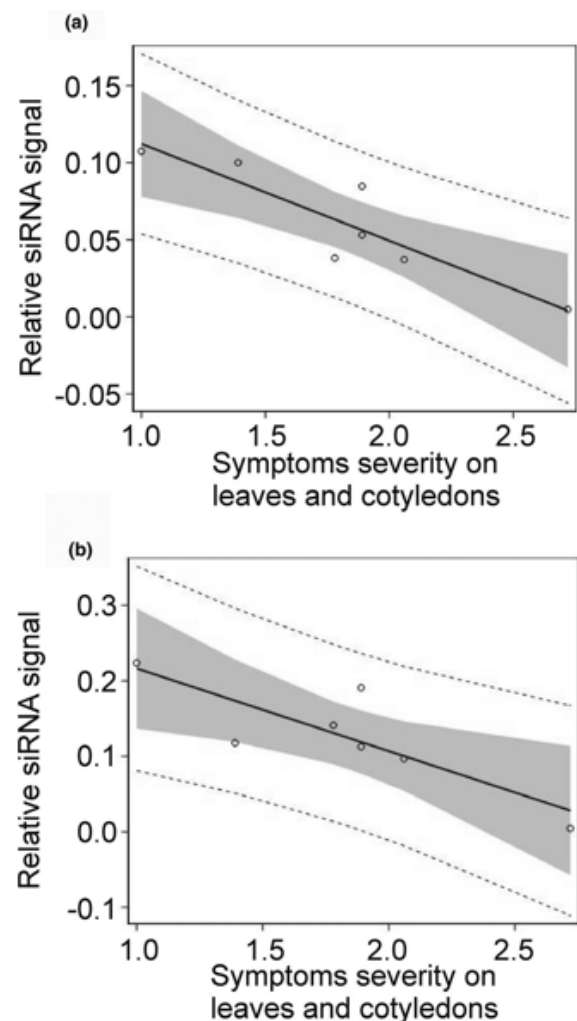
Transgenic and nontransgenic (control) lines were challenged against *F. oxysporum* and *F. graminearum*. The 502 bp fragment of the *F. oxysporum* *CYP51B* gene used for construction of  $\Delta CYP51$  has low identity with the other paralogs in the fungal genome (*FoCYP51A* and *FoCYP51C*) and presents 87.3% identity with the *CYP51B* gene from *F. graminearum* (Figure S1). Disease severity, as well as the effect of the fungi on seed germination and plant and root development, were evaluated. *F. oxysporum* caused severe symptoms, ranging from 2 to 4 on the scale, in the nontransgenic plants 15 days after fungal inoculation on seeds (Figures 2 and 3). Figure 2a presents the reduction in seed germination in nontransgenic plants, showing retarded development, noticed by the presence of the cotyledons, compared to the transgenic seedlings also inoculated with the fungus (Figure 2b). Inoculation with *F. oxysporum* revealed a significant ( $p < .05$ ) reduction in seed germination, which was 83% in the control plants, compared with 100% in all transgenic lines. The symptoms were less severe in transgenic lines 3.22, 1.5, and 9.5 when compared with the control (Figures 2 and 3; Table S1). Line 3.22 revealed almost no symptoms, rating as 1 (Figure 3). Lines 1.5 and 9.5 presented weak symptoms, rating from 1 to 2 (mean = 1.4 and 1.8, respectively). *F. oxysporum* also presented a significant ( $p < .05$ ) effect on root development. Lines 4.22, 2.3, and 3.22 presented higher root dry weight (0.38, 0.38, and 0.35 g, respectively) when compared with the control (0.24 g; Figure 3; Table S1). Similarly, lines 3.22, 9.5, 1.5, and 2.3 presented significantly ( $p < .05$ ) better development (plant height ranging from 8.4 to 9.1 cm) when compared to the nontransgenic line (plant height of 5.1 cm).

Lines inoculated with *F. graminearum* did not present severe symptoms in either transgenic or nontransgenic lines, with severity ranging from 1 to 2 (Figure 3). Similarly, *F. graminearum* did not reveal significant effect on seed germination and root dry weight in either transgenic or nontransgenic plants. However, a significant effect was observed on plant development, measured by plant height, within the transgenic lines, presenting better growth (plant height ranging from 7.4 to 9.1 cm) compared to the nontransgenic line (plant height of 5.5 cm; Figure 3).

A statistically significant correlation was observed between the amounts of siRNA expressed in roots (Pearson correlation  $r = -.89$ ;  $p < .006$ ) and leaves (Pearson correlation  $r = -.83$ ;  $p < .019$ ) with symptom severity observed in aerial parts of the plants inoculated with *F. oxysporum* (Figure 4).

#### 4 | DISCUSSION

The genus *Fusarium* causes several diseases in soybean, leading to severe yield losses. Pathogenic *Fusarium* species can cause withering of the plant, sudden death syndrome, as well as diseases in the seed,



**FIGURE 4** Correlation between siRNA amounts in roots (a) and leaves (b) and symptom severity induced by *Fusarium oxysporum* in the six transgenic soybean lines and control (nontransgenic line). Pearson correlations  $r = -.89$  ( $p < .006$ ) and  $r = -.83$  ( $p < .019$ ), respectively. The correlations were made with the mean of the three repeats, in order to correlate with the siRNA content graphically, which indicates that the higher the siRNA content, the lower the symptom severity of the disease in the plants. Grey area = 95% confidence limits; dashed lines = 95% prediction limits

damping-off of seedlings and root rot, resulting in poor stands, late emergence, and plants showing stunted growth (Zhang et al., 2019). Management of *Fusarium* diseases involves the use of high quality seed, treatment with fungicides, correct planting time, and improved soil conditions, with drainage and no-tillage practices. However, these interventions are limited, costly, and associated with environmental problems. Consequently, host resistance provides a more convenient and cost-effective approach (Machado et al., 2018).

Advances in genetic engineering technologies and understanding of nature in plant protection mechanisms have provided a means

for the development of new strategies for the control of plant diseases, in association with basic management approaches. We first reported that the expression of dsRNA (RNAi strategy) corresponding to a vital fungal gene in genetically modified plants could impair fungal gene expression in the pathogen interacting with plant tissues (Tinoco *et al.*, 2010). Increasing evidence has indicated that RNAi technology can be used to achieve fungus-resistant genotypes (Wang and Dean, 2020). This technology has been shown to be effective on several fungal pathogens, including *Puccinia striiformis* (Zhang *et al.*, 2012), *B. graminis* (Nowara *et al.*, 2010; Pliego *et al.*, 2013), *Puccinia triticina* (Panwar *et al.*, 2013), *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Ghag *et al.*, 2014), *Sclerotinia sclerotiorum* (Andrade *et al.*, 2015), *Bremia lactucae* (Govindarajulu *et al.*, 2015), *Botrytis cinerea* (Wang *et al.*, 2016), and *F. culmorum* (Chen *et al.*, 2016).

We have demonstrated that the introduction of an intron-hairpin cassette for silencing the *Fusarium CYP51B* gene ( $\Delta CYP51$ ) in soybean has generated resistant lines to *F. oxysporum*. Of six soybean transgenic lines tested for resistance to *F. oxysporum*, three lines (3.22, 1.5, and 4.22) presented mild or no symptoms in leaves and roots. Transgenic line 3.22 rated as 1 on the disease severity scale, while northern blot analysis revealed that these lines presented higher amounts of siRNA in leaves and roots. A correlation was observed between siRNA amounts in both leaves and roots and symptom severity, which seems to be significant, taking into consideration the natural complex variation in expression of transgenes in transgenic lines. It might suggest an association between  $\Delta CYP51$  expression and resistance. It has been shown that gene constructs encoding intron-spliced RNA with a hairpin structure can efficiently induce gene silencing (90%–100%; Andrade *et al.*, 2015; Bonfim *et al.*, 2007; Shapulatov *et al.*, 2018). A positive correlation was found between the presence of detectable siRNA and reduction in disease severity in tobacco leaves, transformed for resistance to *S. sclerotiorum* (Andrade *et al.*, 2015). Furthermore, a study involving leaves of *Festuca arundinacea* plants reported that siRNA was observed in plants resistant to the brown patch caused by *Rhizoctonia solani* (Zhou *et al.*, 2016). Another study has confirmed that the expression of siRNA derived from a pathogenicity gene from the fungus *P. striiformis* f. sp. *tritici* was effective in controlling rust disease in wheat (Zhu *et al.*, 2017). Resistance to other *Fusarium* species has been achieved by HIGS strategies for silencing the *CYP51* genes. Resistance to *F. graminearum* was obtained in genetically modified barley and *A. thaliana* (Cheng *et al.*, 2015; Koch *et al.*, 2013).

siRNA analysis revealed a variation of the expression levels in distinct transgenic lines, with a correlation between expression in roots and leaves, except for line 1.5, which was expressed more in roots than leaves, and line 9.5, which was expressed more in leaves than roots. Integration of a foreign gene into the genome is a random process, and studies have shown evidence that the structure of the chromatin surrounding the transgene integration loci has a strong effect on their level of expression (for a review see Kohli *et al.*, 2006).

When genetically modified lines were challenged against *F. graminearum*, no differences were observed in the disease severity, based on symptoms observed in the aerial parts of the plants, nor in root

development, probably due to host–pathogen interaction (soybean cv. BRS7980 versus fungus isolate) aspects. However, a remarkable influence of  $\Delta CYP51$  expression on plant height was observed. It has been shown that most *F. graminearum* isolates are pathogenic to soybean; however, just a few had a significant decrease in shoot development (Barros *et al.*, 2014). The mechanism of natural soybean tolerance to *Fusarium* is unknown, but it could be related to mycotoxin sensitivity, which seems to be different depending on the tissue, explaining how the fungus preferentially affects a specific plant organ (Abeysekara *et al.*, 2016). It was reported that separate loci might control soybean resistance in leaves and roots (Kazi *et al.*, 2008). Roots from cv. BRS7980 could present some tolerance to *F. graminearum*, which could still infect tissues and produce toxins that translocate to affect the stem development and plant height.

Although the results presented here are from greenhouse screenings, there is evidence that indicates a relationship in foliar symptom severity between field and greenhouse results (Navi and Yang, 2008). *Fusarium* spp. cause severe disease problems on a number of crops throughout the world, such as tomato, bean, potato, wheat, and banana. In the present work, it was demonstrated that HIGS could be an effective strategy to engineer resistance to *F. oxysporum* and *F. graminearum* in soybean, and this could be extended to achieve resistance to *Fusarium* spp. in other plant species.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the partial financial support provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal. C.E.B.P. was supported by a fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) and Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP, México).

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

#### ORCID

Cristóbal E. B. Pérez  <https://orcid.org/0000-0003-4594-4876>

Glaucia B. Cabral  <https://orcid.org/0000-0001-6799-4706>

Francisco J. L. Aragão  <https://orcid.org/0000-0003-0570-7673>

#### REFERENCES

- Abeysekara, N.S., Swaminathan, S., Desai, N., Guoc, L. & Madan, K.B. (2016) The plant immunity inducer pipelicolic acid accumulates in the xylem sap and leaves of soybean seedlings following *Fusarium virguliforme* infection. *Plant Science*, 243, 105–114.
- Andrade, C.M., Tinoco, M.L.P., Rieth, A.F., Maia, F.C.O. & Aragão, F.J.L. (2015) Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, 65, 626–632.
- Barros, G.G., Zanon, M.S.A., Chiotta, M.L., Reynoso, M.M., Scandiani, M.M. & Chulze, S.N. (2014) Pathogenicity of phylogenetic species in the *Fusarium graminearum* complex on soybean seedlings in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 138, 215–222.



- Bonfim, K., Faria, J.C., Nogueira, E.O.P.L., Mendes, E.A. & Aragão, F.J.L. (2007) RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 717–726.
- Broders, K.D., Lipps, P.E., Paul, P.A. & Dorrance, A.E. (2007) Evaluation of *Fusarium graminearum* associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. *Plant Disease*, 91, 1155–1160.
- Chen, S., Hu, M., Schnabel, G., Yang, D., Yan, X. & Yuan, H. (2020) Paralogous *CYP51* genes of *Colletotrichum* spp. mediate differential sensitivity to sterol demethylation inhibitors. *Phytopathology*, 3, 615–625.
- Chen, W.X., Kastner, C., Nowara, D., Oliveira-Garcia, E., Rutten, T., Zhao, Y.S. et al. (2016) Host-induced silencing of *Fusarium culmorum* genes protects wheat from infection. *Journal of Experimental Botany*, 67, 4979–4991.
- Cheng, W., Song, X.S., Li, H.P., Cao, L.H., Sun, K., Qiu, X.L. et al. (2015) Host-induced gene silencing of an essential *Chitin synthase* gene confers durable resistance to *Fusarium* head blight and seedling blight in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 13, 1335–1345.
- Cools, H.J., Bayon, C., Atkins, S., Lucas, J.A. & Fraaije, B.A. (2012) Overexpression of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene (*MgCYP51*) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. *Pest Management Science*, 68, 1034–1040.
- Fan, J., Urban, M., Parker, J.E., Brewer, C.H., Kelly, L.S., Hammond-Kosack, E.K. et al. (2013) Characterization of the sterol 14 $\alpha$ -demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific *CYP51* function. *New Phytologist*, 198, 821–835.
- Ghag, S.B., Shekhawat, U.K. & Ganapathi, T.R. (2014) Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium* wilt in banana. *Plant Biotechnology Journal*, 12, 541–553.
- Govindarajulu, M., Epstein, L., Wroblewski, T. & Micheltore, R.W. (2015) Host-induced gene silencing inhibits the biotrophic pathogen causing downy mildew of lettuce. *Plant Biotechnology Journal*, 13, 875–883.
- Hartman, G.L., Huang, Y.H., Nelson, R.L. & Noel, G.R. (1997) Germplasm evaluation of *Glycine max* for resistance to *Fusarium solani*, the causal organism of sudden death syndrome. *Plant Disease*, 81, 515–518.
- Hartman, G.L., Sinclair, J.B. & Rupe, J.C. (1999) *Compendium of Soybean Diseases*. St Paul, MN: American Phytopathological Society.
- Kazi, S., Shultz, J., Bashir, R., Afzal, J., Njiti, V. & Lightfoot, D.A. (2008) Separate loci underlie resistance to soybean sudden death syndrome in 'Hartwig' by 'Flyer'. *Theoretical and Applied Genetics*, 116, 967–977.
- Koch, A., Kumar, N., Weber, L., Keller, H., Imani, J. & Kogel, K.H. (2013) Host-induced gene silencing of cytochrome *P450* lanosterol C14 $\alpha$ -demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 19324–19329.
- Kohli, A., Melendi, P.G., Abranches, R., Capell, T., Stoger, E. & Christou, P. (2006) The quest to understand the basis and mechanisms that control expression of introduced transgenes in crop plants. *Plant Signaling & Behavior*, 1, 185–195.
- Liu, X., Yu, F., Schnabel, G., Wu, J., Wang, Z. & Ma, Z. (2011) Paralogous *cyp51* genes in *Fusarium graminearum* mediate differential sensitivity to sterol demethylation inhibitors. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 113–123.
- Ma, Z. & Michailides, T.J. (2005) Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24, 853–863.
- Machado, A.K., Brown, N.A., Urban, M., Kanyuka, K. & Hammond-Kosack, K.E. (2018) RNAi as an emerging approach to control *Fusarium* head blight disease and mycotoxin contamination in cereals. *Pest Management Science*, 74, 790–799.
- Moscardi, F. & Sosa-Gómez, D.R. (2007) Microbial control of insect pests of soybean. In: Lacey, L.A. and Kaya, H.K. (Eds.) *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Dordrecht: Springer, pp. 815–833.
- Navi, S.S. & Yang, X.B. (2008) Foliar symptom expression in association with early infection and xylem colonization by *Fusarium virguliforme* (formerly *F. solani* f. sp. *glycines*), the causal agent of soybean sudden death syndrome. *Plant Health Progress*. DOI: [10.1094/PHP-2008-0222-01-R5](https://doi.org/10.1094/PHP-2008-0222-01-R5)
- Nelson, B.D. (1999) *Fusarium* blight or wilt, root rot, and pod and collar rot. In: Hartman, G.L., Sinclair, J.B. and Rupe, J.C. (Eds.) *Compendium of Soybean Diseases*, 4th edition. St Paul, MN: American Phytopathological Society, pp. 35–36.
- Nowara, D., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., Ridout, C., Douchkov, D. et al. (2010) HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell*, 22, 3130–3141.
- Panwar, V., McCallum, B. & Bakkeren, G. (2013) Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the Barley stripe mosaic virus. *Plant Molecular Biology*, 81, 595–608.
- Pliogo, C., Nowara, D., Bonciani, G., Gheorghe, D.M., Xu, R., Surana, P. et al. (2013) Host-induced gene silencing in barley powdery mildew reveals a class of ribonuclease-like effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6, 633–642.
- Shapulatov, U., van Hoogdalem, M., Schreuder, M., Bouwmeester, H., Abdurakhmonov, I.Y. & Van der Krol, A.R. (2018) Functional intron-derived miRNAs and host-gene expression in plants. *Plant Methods*, 14, 83.
- Tian, B., Li, J., Oakley, T.R., Todd, T.C. & Trick, H.N. (2016) Host-derived artificial micro RNA as an alternative method to improve soybean resistance to soybean cyst nematode. *Genes*, 7, 122.
- Tinoco, M.L.P., Dias, B.B.A., Dall'Asta, R.C., Pamphile, J.A. & Aragão, F.J.L. (2010) In vivo trans-specific gene silencing in fungal cells by in planta expression of a double-strand RNA. *BMC Biology*, 8, 27.
- Vollmann, J. (2016) Soybean versus other food grain legumes: a critical appraisal of the United Nations International year of pulse. *Journal of Land Management, Food and Environment*, 1, 117–124.
- Wang, M. & Dean, A.R. (2020) Movement of small RNAs in and between plants and fungi. *Molecular Plant Pathology*, 21, 589–601.
- Wang, M., Weiberg, A., Lin, F.M., Thomma, B.P.H.J., Huang, H.D. & Jin, H. (2016) Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Natural Plants*, 2, 16151.
- Yoo, B.C., Kragler, F., Varkonyi, G.E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M. et al. (2004) A systemic small RNA signaling system in plants. *The Plant Cell*, 16, 1979–2000.
- Yoshida, Y. (1993) Lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (cytochrome P45014DM). In: Schenkman, H. and Grein, K. (Eds.) *Cytochromes P450*. Berlin: Springer, pp. 627–639.
- Zhang, C., Zhao, X., Qu, Y., Teng, W., Qiu, L., Zheng, H. et al. (2019) Loci and candidate genes in soybean that confer resistance to *Fusarium graminearum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 132, 431–441.
- Zhang, H., Guo, J., Voegelé, R.T., Zhang, J.S., Duan, Y.H., Luo, H.Y. et al. (2012) Functional characterization of calcineurin homologs *PSCNA1/PSCNB1* in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* using a host-induced RNAi system. *PLoS One*, 7, e49262.
- Zhang, Z., Xing, A., Staswick, P.E. & Clemente, T.E. (1999) The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell & Tissue Organ Culture*, 56, 37–46.
- Zheng, B., Yan, L., Liang, W. & Yanga, Q. (2019) Paralogous *Cyp51s* mediate the differential sensitivity of *Fusarium oxysporum* to sterol demethylation inhibitors. *Pest Management Science*, 75, 396–404.
- Zhou, B., Bailey, A., Niblett, C.L. & Qu, R. (2016) Control of brown patch (*Rhizoctonia solani*) in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) by host induced gene silencing. *Plant Cell Reporter*, 35, 791–802.

Zhu, X., Qi, T., Yang, Q., He, F., Tan, C., Ma, W. et al. (2017) Host-induced gene silencing of the MAPKK gene *PsFU27* confers stable resistance to wheat stripe rust. *Plant Physiology*, 4, 1853–1863.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Pérez CEB, Cabral GB, Aragão FJL. Host-induced gene silencing for engineering resistance to *Fusarium* in soybean. *Plant Pathol.* 2020;00:1–9. <https://doi.org/10.1111/ppa.13299>